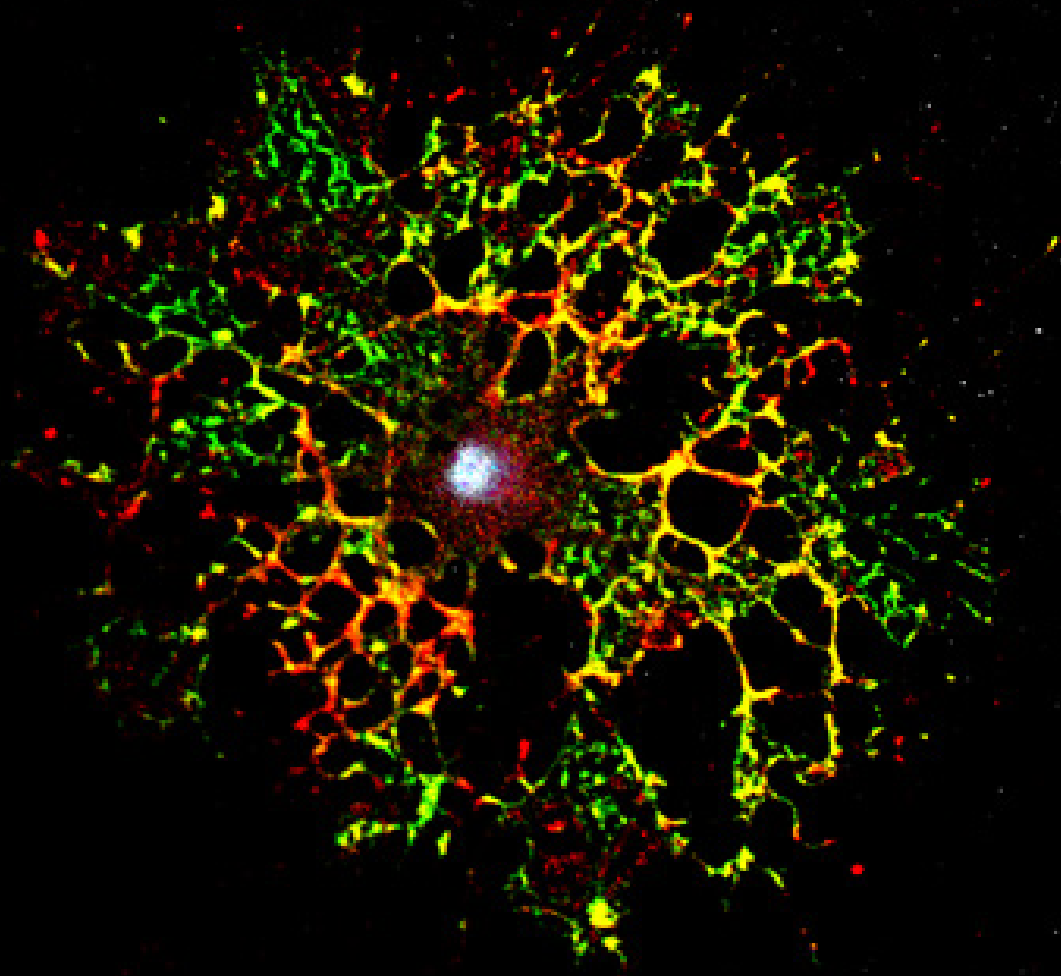


TESIS DOCTORAL

Las células mieloides supresoras como
inmunomoduladores endógenos del sistema nervioso
central en neuroinflamación: implicaciones en esclerosis
múltiple



Carolina Melero Jerez
2018

El Dr. Fernando de Castro Soubriet, Investigador Principal del Grupo de Neurobiología del Desarrollo-GNDe (Instituto Cajal-CSIC), y el Dr. Diego Clemente López, Investigador principal del Grupo de NeuroInmuno-Reparación (Hospital Nacional de Paraplégicos),

AUTORIZAN, la presentación de la Tesis Doctoral titulada: “Las células mieloides supresoras como inmunomoduladores endógenos del sistema nervioso central en neuroinflamación :implicaciones en esclerosis múltiple”, realizada por la Lda. Carolina Melero Jerez, bajo nuestra co-dirección y supervisión en el Hospital Nacional de Paraplégicos y el Instituto Cajal-CSIC, y que presenta para la obtención del grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que así conste, y a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Madrid, a 14 de marzo de 2018.

Fdo. Dr. Fernando de Castro Soubriet

Fdo. Dr. Diego Clemente López

Grupo de Neurobiología del Desarrollo
Instituto Cajal-CSIC
Av. Doctor Arce, 37
28002-MADRID
ESPAÑA
TEL.: 91 585 46 50

Grupo de NeuroInmuno-Reparación
Hospital Nacional de Paraplégicos
Finca La Peraleda s/n
45071-TOLEDO
ESPAÑA
TEL.: 925 247782

A mis padres, mi hermano, mi cuñada y mis sobrinos

“Remember to look up at the stars and not down at you feet. Try to make sense of what you see and wonder about what makes the universe exist.

Be curious.

And however difficult life may seem, there is always something you can do and succeed at. It matters that you don’t just give up.”

(Stephen Hawking)

“Todos los individuos, en cuanto que seres humanos, y aún más, en cuanto que científicos y educadores, deben asumir como una obligación moral el deber de afrontar las problemáticas que afligen al género humano usando en su máximo grado las capacidades racionales que poseen, aun cuando ello signifique luchar contra los intereses establecidos por las esferas de influencia vinculadas a los círculos de poder.”

(Rita Levi-Montalcini: *Atrévete a saber*)

FUENTES DE FINANCIACIÓN

La autora de esta Tesis Doctoral disfrutó de una ayuda predoctoral del Programa para Personal Investigador en Formación (BES-2013-062630) del Ministerio de Economía y Competitividad-MINECO (BES- 2013-062630), asociada al proyecto SAF2012-40023 y, posteriormente, PI15/00963, ambos proyectos del citado Ministerio. Actualmente, la Lda. Carolina Melero Jerez está contratada por el proyecto SAF2015-72325-EXP del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad-MINEICO, que ha sido completado por una donación de la Asociación Española de Esclerosis Múltiple AEDEM-COCEMFE.

El trabajo científico ha sido sufragado con fondos del Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2012-40023; SAF2016-77575-R; PI15/00963) y de la Red Española de Esclerosis Múltiple (RD07-0060-2007, RD12-0032/0012, RD16-0015-0019, parcialmente cofinanciados por F.E.D.E.R. Unión Europea “Una manera de hacer Europa”), del Programa ReTics del Instituto de Salud Carlos III/Ministerio de Economía y Competitividad-MINECO), el Consejo Superior de Investigaciones Científicas-CSIC (CSIC-2015201023) y la Fundación ARSEP (Francia). El laboratorio del Dr. Clemente está financiado, además, por ADEM-TO, Aciturri Aeronáutica SLU, Vesuvius Ibérica y Fundación Galletas Coral.



Unión Europea

Fondo Europeo de Desarrollo Regional
“Una manera de hacer Europa”



AGRADECIMIENTOS

Y por fin ha llegado ese momento que tanto he esperado. El momento de poner por escrito a todas esas personas sin las cuales esta Tesis no habría sido posible. Quienes me conocen saben cómo me emocionan estas cosas, y saben que después de estos años de trabajo, estas líneas representan para mí el broche final y redondo. Como muchas veces he repetido, si de algo me enorgullezco es de la buena gente que me rodea, que ha estado durante este proceso de maduración y que espero que siga por mucho tiempo. Si algo se aprende en la etapa predoctoral es a rodearse siempre de muy buenas personas, porque de ello dependerá en gran parte el resultado. Esta tesis se la debo a tantas personas que espero no olvidarme de nadie.

En primer lugar, me gustaría agradecer su apoyo a mis dos directores de tesis, Fernando de Castro y Diego Clemente; sin vuestro apoyo y vuestra confianza no estaría escribiendo estos agradecimientos. A Fernando, por acogermme en su grupo y darme la posibilidad de emprender mi carrera científica, por acompañarme en este camino desde el principio y por ofrecerme todo el apoyo necesario para sacar adelante esta Tesis. A Diego, por ser mi maestro en la poyata, por enseñarme a pensar, por acompañarme, y por escuchar todas esas “pedradas en la cabeza” que tenía de vez en cuando y que con tanta mano me has ayudado a encauzar, por tus correcciones, tus sugerencias y tus consejos. También por tantas risas... siempre recordaré cuando te enseñé la gráfica del millón de asteriscos y tu cara de desconcierto. Por ser algo más que mi director: mi apoyo.

A todos mis compañeros de GNeD, presentes y pasados. A Ana, por todo tu apoyo tanto en Toledo como en Madrid. A Cris, por escucharme y enseñarme a trabajar en la poyata desde el principio. Por toda tu ayuda, por los madrugones a mi costa, y porque eres una persona maravillosa. A Eva, con Richard “mis amigos de Miami”. Gracias por tu serenidad y acompañarme en mis inicios y por todo tu apoyo. A Carmen, hemos coincidido porquito pero me ha bastado para ver que eres una gran investigadora y mejor persona. A Ana Cristina, por su gran trabajo. A Esther y Aitana. Gracias por la parte de vuestro trabajo de esta tesis. Gracias por todo vuestro esfuerzo. Aitana, gracias por todos los buenos momentos que hemos vivido juntas, te deseo todo lo mejor.

A mis compañeros del lab A14-15 del Instituto Cajal. A Mario, con sus locuras y su techno. A Pablo, codo con codo nos hemos apoyado estos últimos meses; te deseo todo lo mejor y estoy segura de que vas a ser un gran científico. A Bea, muchas gracias por escucharme, por tus consejos de diseño y por estar ahí estos últimos meses. También gracias por las fotos y los análisis. Sin tu ayuda este camino habría sido mucho más largo. Seguro que te va a ir todo genial (y no te

preocupes que los insertos llegarán algún día...). A Belén; fue poquito tiempo el que compartimos poyata pero el suficiente para dejar tu huella en mí. Gracias por tu apoyo. A Amel, Eva, Nikolle.

A Rafa... no sé ni por dónde empezar. Sabes que tendrías que estar conmigo el día de la defensa ahí arriba en el “escenario”, que esta tesis es tan tuya como mía. Por todos esos ratitos de animalario, por todos esos fines de semana compartidos o retransmitidos, por los miles de mensajes de Whatsapp comentando la jugada (y no del Real Madrid, ni local) y el parte de lesiones de oreja-derecha y dos-derecha, por esas discusiones científicas épicas en las que empezábamos viéndolo todo negro y acabábamos con mil propuestas de patentes, por aguantar tan estoicamente todas mis derivas emocionales, por enseñarme tantas y tantas cosas... Porque te voy a echar mucho de menos, y porque es muy difícil encontrar una persona tan válida con quien trabajar codo con codo, tan amante de su trabajo, tan entregada, y con tan buen corazón. Porque gracias a ti todo ha sido más fácil, porque si tú no hubieras estado yo no habría llegado al final. Te mereces todo lo mejor.

A mis dos mejores compañeras de laboratorio, mis amigas, Isa e Iris. Cuando llegué a Toledo no podía pensar que iba a encontrarme con esas dos patas fundamentales de mi vida. A vuestra valía profesional se une un corazón de oro. Gracias por todo vuestro apoyo, personal y profesional, por esos viajes (tan internacionales como Marruecos o Escocia o tan locales como nuestras épocas de “bañooooo”), por haber pasado miedo y aventuras juntas, porque las mudanzas son siempre una oportunidad de hacer hasta un reportaje de la tele, por saber sacar partido de quedarnos encerradas por la lluvia bailando bachata, por haber sobrevivido a secuestros, a intentos de robo de coche por un *baywatch*, por haber visto amanecer en el desierto (al menos, vosotras). Gracias por hacerme pasar envidia de vuestro “mejor desayuno en el desierto”. Gracias porque los transportes con vosotras siempre han sido divertidos, ya sea en camello, en kangoo con multa incluida, conduciendo por la derecha o por la izquierda. Isa, gracias por dejarme ser tu okupa estos últimos largos meses, por tus tapers, por tu habitación, por tus conversaciones de horas y horas... es imposible agradecerte tantos buenos ratitos. Es difícil encontrar una persona con tan buen corazón y que me haga sentir siempre tan querida. También gracias a Felipe, me has visto en mis mejores y peores momentos. Juntos habéis hecho fácil lo difícil. A Iris... qué te voy a decir. Que cuando tú andas cerca parece que el aire es diferente. Que eres lo más cercano que se puede estar de un alma gemela, porque me has sabido entender y porque me has ayudado a seguir adelante cuando todo se hacía cuesta arriba. Y porque estoy deseando ver qué nos depara la vida. Porque allá donde estés, esa será mi “zona de confort”.

A Sonia, mi *labmate* y amiga. Porque me has acompañado en los momentos más difíciles de este largo camino. Porque has estado ahí para animarme, para sacar adelante el laboratorio entre las dos, mano a mano, lloro a lloro y resolviendo el mundo en la cámara fría. Porque quería decirte lo que valoro tu positividad y tus ganas de comerse el mundo, y porque eres el ejemplo de que “quien quiere, puede”. Te deseo todo lo mejor en tu carrera, y que celebremos los éxitos juntas.

A Virginia. Para mí, la citometría de flujo siempre serás tú. Te agradezco todos los esfuerzos que has hecho estos años, esos madrugones, esas explicaciones para tontos hasta que entendía ese complejo mundo que tú controlas a la perfección. Por enseñarme tanto a separar MDSCs como a respirar y tomar distancia para recargar fuerzas. Porque esta tesis no habría salido adelante si no hubieras estado al pie del cañón. Y porque no importa dónde esté, siempre cruzaré lluvias, carreteras y ascensores para ir a recoger un tubo, si eres tú quien me llama.

A José Ángel y Javi. Porque sois los que más controláis de microscopía, porque sois capaces de sacar verdaderas obras de arte de nuestras muestras (como lo avalan vuestros premios de NeuroArte). Por vuestra paciencia y vuestros consejos, por las horas extra en el InCell y en el Confocal, por vuestras macros y vuestro apoyo.

Gracias al laboratorio del Dr. Óscar Fernández, en el Hospital Regional Carlos Haya de Málaga. En especial a Marga, por toda tu ayuda, tu apoyo y porque esta colaboración no habría sido lo mismo si no hubieses estado tú al mando.

A Rafa Moreno. Gracias por esos cafés, por esas conversaciones tan reconstituyentes en el chiringuito del Hospital, por tus ánimos y tu apoyo. Gracias por confiar en que podía sacar esto adelante.

Al laboratorio del Dr. Robin Franklin, en la Universidad de Cambridge, por darme la oportunidad de desarrollar parte de esta tesis en un grupo de tanta categoría. A Alerie, porque mi estancia en Cambridge fue un placer a tu lado. Gracias por apoyarme cuando más perdida estaba, gracias por hacerme sentir en casa, y gracias por enseñarme nuevas técnicas y formas de pensar.

A mis “Neurospocacosa”: Tamara, Elisa, Rebeca y Alex. Porque sois majísimos. Porque con nadie he comido tanto chocolate como con vosotros. Aún recuerdo ese batido de Nutella con helado de vainilla, mmm! Porque habéis sido quienes más me habéis entendido en este mundillo de la Neurociencia. Porque aprendí a amarla con vosotros, desde aquellas clases en Seminario 1 y en la sala de Anatomía. Porque, aunque a veces no encontremos hueco en esa agenda tan ocupada que tenemos todos, me siento muy conectada con vosotros. Y porque somos unos valientes, todos!

A mis “amigas de Cambridge” (aunque seáis españolas): Laura, Eva y Amanda. Porque es tan difícil encontrar personas con las que encajar tanto en tres meses, que aún no me creo que os haya conocido. Porque siempre agradeceré a mi estancia el haberme cruzado con tres bellísimas personas. Porque Atenea sois vosotras y porque los búhos son sabiduría pero también son amistad de la buena. Esto no ha hecho más que empezar.

A mis compañeras de piso, Mari y Lidia. Qué os voy a decir... que me habéis acompañado en esta última etapa, y que lo sabéis todo. Que me habéis visto llorar, reír, odiar y amar la ciencia. Gracias por tragáros todas mis fotos de celulillas (aunque siempre os parezcan la misma, ¿verdad Mari?) Porque el despliegue de medios audiovisuales y culinarios para el vídeo de mi tesis fue espectacular. Porque aunque no tengamos de na', lo tenemos todo muy limpio. Y porque la tesis la llevo... mitad! Gracias por estar ahí, por esos tappers de comida que me hacen pasar los días en el laboratorio de otra forma. Por esas series, esas risas, esos vídeos de youtube.

Gracias a Blablacar, por patrocinar todos mis viajes a Pamplona.

Gracias a mi amiga, Patri. Contigo, no tengo palabras. Desde que te conocí en Odense, desde que nos tirábamos al suelo para comprobar si contábamos como bicicletas... has estado ahí. Porque me atrevo a decir que eres la persona que más me ha acompañado en esta tesis. Porque me has dado alojamiento, familia, amistad, apoyo, reprimendas cuando las necesitaba, distracción, cariño, porque contigo me he hecho un poquito más madrileña, por tu paciencia y porque es un tesoro tenerte como amiga. Para ti empieza también otra etapa, y desde estas líneas os quiero dar a ti y a Dani la enhorabuena y desearos todo lo mejor. Gracias por estar en mi vida. Gracias también a tus padres, Marga y Antonio, gracias por ser mi “familia de Madrid”.

A Juan y a Bengo, con Patri, mis amigos del erasmus. Juan, gracias por esas visitas y gracias por hacerme amar Málaga. Gracias por esos veranos en los que la única preocupación era encontrar sitio para aparcar en la playa del Palo. Gracias por esas ferias todos juntos, a veces incluso a gastos pagados. Bengochis, mi contrincante por excelencia de squash. Hemos crecido juntos en esto (Alberto no cuenta). Gracias por escucharme, y gracias por ofrecerme esa válvula de escape, por escucharme, por entenderme. Gracias por vuestra amistad.

A Lola Ledesma y a mis compañeros del lab122 del CBM, en especial a Enrique, Stefano y Azu. Durante mi etapa allí me sentí como en casa, aprendí a trabajar en un laboratorio a la vez que conocía a personas maravillosas. Azu, nunca olvidaré nuestras horas y horas en el

ríg, con esos efluvios cargados de sustancias maliciosas, porque no hay otra explicación a esas risas nocturnas mientras registrábamos neuronas. Gracias por todo tu apoyo en mis inicios.

A Irene, gracias por haberme escuchado cuando más lo necesitaba, y por ayudarme a seguir adelante. Gracias por entenderme tan bien.

Gracias a toda esa gente maravillosa que he conocido en el Cajal. Al servicio de Microscopía, Belén y Carmen, por ser tan profesionales. A Emi, por ser la portadora de la buena nueva: tus llamadas significan parto. A Yago, porque sabes mucho de lo tuyo, y nos ayudas en todo lo que puedes, y a toda la gente de Administración. A Elvira; gracias por esas conversaciones en la sala de microscopios, insuperables. Porque contigo es posible hablar de ciencia y de boludeces al mismo tiempo. Gracias por esos cafés, por estar ahí en estos últimos meses. Porque ojalá te hubiese conocido antes, y porque estoy segura de que ahora sí, vuelvo a Argentina. A Estibaliz, gracias por todos tus ánimos, tus consejos, gracias por enseñarme la excelencia del pensamiento científico, y por hacerme partícipe de ese trabajo tan maravilloso que tienes entre manos. A Diana, cultivos es diferente si estás tú en la A. Gracias por estos últimos meses de conversaciones de todo. A Iris, por apoyarme y saber entenderme. Porque no hay nada como estar en el mismo punto para conectar. A Marieta, por tu ayuda en todas estas últimas gestiones y por enseñarme el programita que me ha permitido montar este libro, por tus consejos y tu comprensión. A Eva, porque contigo aprendí lo que es escribir una tesis. A Cagla, por tu sonrisa siempre permanente. A Anna, por esas juergas juntas. A Lluís, porque la estadística y R ya no volverán a ser lo mismo para mí. Gracias por ese entusiasmo, por ofrecerme tu ayuda, por el pádel y por el squash. Estoy segura de que algo grande está por salir de todas tus maquinaciones.

Gracias a todos esos animalitos peludos que me han acompañado en estos años. A Missy, Minu, Golfo, Nala y Equis. Especialmente a Equis, que ha escrito la Tesis conmigo, mano a mano, garra a garra. Si hay alguna letra que no corresponde en el texto, es obra suya. Gracias también a todos los ratones que han colaborado en este trabajo, esperemos que llegue un día en que no seáis necesarios.

Gracias a mi cuadrilla, la mejor que se puede tener: Adri, Xita, Fai, Muri, Marta, Maje, Noe y Mai. Porque, a pesar de todo, a pesar de que los tiempos cambien, de que cada una lleve su ritmo, de que la distancia a veces nos separe... seguís siendo un apoyo para mí. Gracias por ser mis AMIGAS, en mayúscula. Porque eso es lo que se merecen las personas que permanecen en tu vida desde que éramos niñas y comíamos pipas en un banco. Porque nos hemos hecho mayores juntas, porque me habéis acompañado, escuchado, aguantado a veces, porque hemos cantado a voz en grito, porque hemos

pretendido ser duendes, chicles aplastados por una zapatilla, mimos, piratas, obreras, calamares a la romana y miles de personajes cada vez que llegaba año nuevo. Porque cada Txupinazo es un nuevo comienzo, porque las conversaciones con vosotras siempre arreglan el mundo, aunque sea por unos minutos, o al menos mi mundo. Porque las fiestas de Beriáin, de Falces y de Estella nunca se nos olvidarán. Porque este es mi pequeño homenaje a tantos años juntas, y a tantos otros que nos vienen por delante. Porque estemos donde estemos, siempre seréis el grupo de mis AMIGAS. En especial, a Fai. Gracias por ser como eres, por estar ahí siempre sin excepción. Porque juntas podemos con todo.

A Wes, por ser mi apoyo en los primeros años de la tesis. Gracias por escucharme y por acompañarme.

Y por último, gracias a mi familia kaos. Gracias, chache y Marta, por todo vuestro cariño y por haberme hecho tía de esos dos bichejos maravillosos, Javi y Santi. Porque Pamplona ahora siempre es ilusión si sé que les voy a ver, porque son el mejor tesoro que se puede tener. Javi, eres increíble y tan listo que cada vez que te veo me sorprende todo lo sabes, y porque no he escuchado a un niño de 5 años decir “oligodendrocito” como tú. Estoy segura de que vas a poder con todo lo que te propongas. Santi, aún eres muy pequeñito pero ya apuntas maneras. Sólo con verte reír ya sé que no se te va poner nada por delante. Y gracias, cómo no, a mis padres. No habría llegado a este punto si no hubiese sido por vosotros. Esta tesis va enteramente dedicada a vosotros. Habéis sido quienes habéis apostado por mí en todo momento, desde el día en que decidí entrar en un mundo tan bonito y difícil como es la investigación. Habéis sido un apoyo vital en toda mi etapa en Madrid y Toledo, así como durante la carrera en Pamplona. Gracias por no dudar nunca de mí, por escucharme, por alegraros cuando las cosas me salían bien, gracias por hacerme ver que puedo con todo, gracias por estar ahí. Os quiero.

RESUMEN

Las células mieloides supresoras (MDSCs) constituyen una población de células de linaje mieloide, características inmaduras y alta capacidad inmunosupresora. Su papel en enfermedades autoinmunes, y sobre todo, aquellas del sistema nervioso central (SNC), está en actual evolución. Entre ellas, la esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad con un alto componente autoinmune y que conlleva un grado variable de desmielinización, siendo la variante más frecuente la remitente-recurrente, con fases de incremento de síntomas seguidas de períodos de remisión. Para que se produzca esa transición, es necesaria la participación de agentes celulares y moleculares que limiten la respuesta inmune y favorezcan la reparación del tejido. A este respecto, las MDSCs se han demostrado estar presentes a lo largo del curso clínico del modelo animal más usado para la esclerosis múltiple, la encefalomielitis experimental autoinmune (EAE), infiltrándose en el SNC y promoviendo la apoptosis de los linfocitos T autorreactivos. La alta plasticidad de estas células y su capacidad de adquirir funciones pro- o anti-inflamatorias dependiendo del ambiente circundante, abre las puertas para su modulación farmacológica. Además, el viraje funcional hacia la activación alternativa de las células del sistema inmune se ha relacionado con efectos neuroprotectores y regeneradores sobre los oligodendrocitos en todo su linaje y sobre la mielina. Sin embargo, la contribución de las MDSCs en estos procesos está aún por explorar. En la presente Tesis Doctoral se demuestra no sólo la modulación de esta población con uno de los fármacos de primera línea en EM, el IFN- β , hacia un fenotipo más inmunosupresor; sino la conexión directa entre su contenido periférico (en órganos inmunes) y central (SNC) con el grado de destrucción/regeneración tisular y las consecuencias a nivel clínico. Además, se describen por primera vez los efectos de las MDSCs sobre la proliferación, supervivencia, migración y diferenciación de las células precursoras de oligodendrocitos (OPCs), así como sobre los procesos de remielinización. De este modo, esta Tesis Doctoral sienta las bases para el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas que conlleven el manejo de este plástico tipo celular en diversos aspectos de la esclerosis múltiple, tanto como herramienta terapéutica y de pronóstico, así como para el diseño de estrategias de reparación de la lesiones desmielinizantes.

ABSTRACT

The MDSCs represent a population of cells of the myeloid lineage, with immature properties and a high immunosuppressive activity. Their role in autoimmune diseases, and above all, those of the central nervous system, is under intense research. Among them, multiple sclerosis is a disease with a relevant autoimmune component, accompanied by a variable degree of demyelination. The Relapsing-Remitting is the most frequent multiple sclerosis clinical variant, characterized by phases with increasing neurological symptoms (relapses) and periods of partial recovery (remissions). This implies the existence of cellular immunomodulatory agents to promote the relapsing-to-remitting transition and the tissue repair. MDSCs have been shown to transiently enter the spinal cord of EAE mice, showing a parallel density to the severity of the symptoms, and participate in the control of the immune response by accelerating T cell apoptosis. The high plasticity of these cells and their capacity to acquire both pro- and anti-inflammatory functions depending on the surrounding environment set the basis for their pharmacological modulation. Besides, the functional switch towards the alternative activation of the immune cells has been related to neuroprotective/neuroregenerative effects over oligodendrocytes and myelin. However, the contribution of MDSCs in these processes is still unexplored. In the current PhD Thesis it is shown not only the MDSC modulation by one of the first-line drugs for MS, i.e IFN- β , towards an enhanced immunosuppressive phenotype; but also the direct connection between their peripheral (immune organs) and central content with the degree of tissue disruption/regeneration and the clinical consequences. In addition to that, the effects of the MDSC soluble factors over the proliferation, survival, migration and differentiation of OPCs, as well as their role in remyelination, are firstly described. This PhD Thesis adds new insights into the design of new therapeutic tools involving the management of MDSCs in various aspects of multiple sclerosis, both as a therapeutic and prognostic tool, together with the development of new strategies for the repair of the demyelinating lesions.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico
AI: Índice de Agresividad
APC: Alofococianina
APC: Célula Presentadora de Antígeno
ApoE4: Apolipoproteína E4
Arg-I: Enzima Arginasa 1
ARMSS: Escala de Severidad de Esclerosis Múltiple Relacionada con la Edad
BHE: Barrera Hematoencefálica
BrdU: 5-Bromo-2-Desoxiuridina
CAM: Universidad de Cambridge
CAT: Transportadores Catiónicos de Aminoácidos
CCL: Ligando del Receptor de quimiocinas con motivo C-C
CCR: Receptor de quimiocinas con motivo C-C
CD: Subgrupo de Diferenciación
CDK: Enzima Quinasa Dependiente de Ciclina
CFA: Adyuvante Completo de Freund
CGMP: Precursor Común de Granulocitos/ Monocitos
CIS: Síndrome clínicamente aislado
CMP: Progenitores Mieloides Comunes
CNF-1: Factor Neurotrófico Ciliar 1
CNPasa: 3'-Fosfodiesterasa de 2',3'-Nucléotidos Cíclicos
CombiWISE: Puntuación ajustada de Discapacidad Combinada con el Peso
COX2: Enzima Citocromo Oxidasa 2
CT: Grupo control
CTLA-4: Antígeno 4 asociado a Linfocitos T

Citotóxicos
DCs: Células Dendríticas
DIV: Días *In Vitro*
DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMT: Tratamiento Modificador de la Enfermedad
Dpi: Días Post-Inmunización
Dpl: Días Post-Lesión
EAE: Encefalomiелitis Experimental Autoinmune
EAE-IFN- β : grupo tratado con IFN- β
EAE-Veh: grupo tratado con Vehículo
EC: Tinción de Eriocromo Cianina
ECM: Matriz Extracelular
EDSS: Escala del Estado de Incapacidad Ampliada de Kurtzke
EM: Esclerosis Múltiple
e-MDSCs: MDSCs de Estadíos Tempranos
EM-PP: Esclerosis Múltiple Primaria Progresiva
EM-PR: Esclerosis Múltiple Progresiva Recurrente
EM-RR: Esclerosis Múltiple Remitente-Recurrente
EM-SP: Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva
F12: Medio de Ham
FACS: Selección Celular Activada por Fluorescencia
FasL: Ligando de la proteína Fas
FBS: Suero Fetal Bovino
FCR: Receptor de la Fracción Constante
FGF: Factor de Crecimiento de Fibroblastos
FITC: Isotiocianato de Fluoresceína
FLT3: Proteína tirosín-quinasa 3 tipo FMS

FMO: Fluorescencia Menos Uno

Foxp3: Factor de Transcripción “*Forkhead box 3*”

GA: Acetato de Glatirámero

GCs: Enzima Guanilato Ciclasa Soluble

GFAP: Proteína Ácida Fibrilar Glial

GM-CSF: Factor de Estimulación de Colonias de Granulocitos-Macrófagos

GMPC: Guanosina 3’5’ Monofosfato Cíclica

GPC: Células Precursoras Gliales

GVHD: Enfermedad derivada de Rechazo de Injerto frente a Huésped

GWAS: Estudio de Asociación de Genoma Completo

HBSS: Solución Salina Equilibrada de Hank

HLA: Antígeno Leucocitario Humano

HNP: Hospital Nacional de Paraplégicos

HRCH: Hospital Regional Carlos Haya

HSC: Células Madre Hematopoiéticas

IC: Instituto Cajal

ICQ: Inmunocitoquímica

IFN: Interferón

IFNAR: Receptor de Interferón alpha/beta

IGF-1: Factor de Crecimiento de Insulina tipo 1

IHQ: Inmunohistoquímica

IL: Interleuquina

IL-4R α : Receptor alpha de Interleuquina 4

IMC: Células Mieloides Inmaduras

IMDM: Medio de Dulbecco modificado por Iscove

IMos: Monocitos Inflamatorios

iNOS: Enzima óxido Nítrico Sintasa inducible

iPS: Células Madre Pluripotentes Inducidas

IQR: Rango intercuartílico

IRF: Factor de Respuesta a Interferón

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LINGO-1: Proteína 1 de Interacción con el receptor de Nogo rica en Repeticiones de Leucina y dominio tipo inmunoglobulina

LOX-1: Receptor tipo Lectina de LDL Oxidado

LPC: Lisolectina o Lisofosfatidil Colina

LPS: Lipopolisacárido

LXR: Receptor X del Hígado

M1: Activación Clásica

M2: Activación Alternativa

MACS: Selección Celular Activada Magnéticamente

MAG: Glicoproteína Asociada a Mielina

MBP: Proteína Básica de Mielina

M-CSF: Factor de Estimulación de Colonias de Macrófagos

M-CSFR: Receptor del M-CSF (CD115)

MDSC-CM: Medio Condicionado de MDSCs

MDSC-IFN- β : MDSCs tratadas con IFN- β

MDSC-LC: Células tipo MDSC

MDSCs: Células Mieloides Supresoras

MDSC-Veh: MDSCs tratadas con Vehículo

MDSS: Escala de Severidad basada en la EDSS

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

M-MDSCs: MDSCs monocíticas

MOG: Glicoproteína de Mielina de Oligodendrocitos

MRI: Imagen por Resonancia Magnética

MWB: Tampón de lavado de Miltenyi

MyD88: Factor de Diferenciación Mieloide 88
MyRF: Factor regulador de mielina
NAc: N-Acetil-Cisteína
NDS: Suero Normal de Burro
NFH: Cadena Pesada de Neurofilamentos
NF-M: Neurofilamento medio
NG2: Antígeno 2 Neuroglial (proteoglicano condroitín sulfato 4)
NKT: Células T “*natural killer*”
NO: Óxido Nítrico
NPC: Células Progenitoras Neuroepiteliales
NPCs: Células Precursoras Neurales
OCT: Tomografía por Coherencia Óptica
OPCs: Células Precursoras de Oligodendrocitos
P/S: Penicilina-Estreptomicina
PO: Edad Postnatal de 0 días
P7: Edad Postnatal de 7 días
PB 0,1 M: Tampón Fosfato 0,1 M y pH 7,4
PBS 1X: Tampón Bifosfato Salino 1X y pH 7,4
pDC: Células Dendríticas Plasmacitoides
PDGF: Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
PDGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
PE: Ficoeritrina
PerCP: Proteína Clorofílica de Peridinium
PET: Tomografía por Emisión de Positrones
PFA: Paraformaldehído
PI3K: Enzima Fosfoinositol 3-Quinasa
PLP: Proteína Proteolipídica
PMN-MDSCs: MDSCs Polimorfonucleares
PPAR: Receptor Activador de Proliferación del Peroxisoma

PSA-NCAM: Molécula de Adhesión Celular Neural modificada con Ácido Polisiálico
RNA: Ácido Ribonucleico
ROS: Especies Reactivas de Oxígeno
RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute
RT: Temperatura Ambiente / *Room Temperature*
RXR: Receptores X de Retinoides
SC: Médula Espinal / *Spinal Cord*
SEM: Error Estándar de la Media
Shh: Sonic Hedgehog
SMI-32: Neurofilamento H no Fosforilado
SNC: Sistema Nervioso Central
STAT: Señal de Activación de la Transcripción y la Traducción
TAM: Macrófagos asociados a tumores
T reg: Linfocitos T Reguladores
TCR: Receptor de Linfocito T
TGF- β : Factor de Crecimiento Transformador beta
Th: linfocito T cooperador o “*helper*”
TLR: Receptor Tipo Toll
TMEV-IDD: Enfermedad Desmielinizante Inducida por el virus de Theiler de la Encefalitis murina
TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alpha
TSA: Amplificación de la Señal con Tiramida
TUNEL: Marcado de final de Corte Mellado de dUTP con la enzima Transferasa Desoxinucleotidil Transferasa
VDR: Receptor de la Vitamina D
VTL: Vídeo Time-Lapse

ÍNDICE

I. AUTORIZACIÓN DIRECTORES DE TESIS

II. FUENTES DE FINANCIACIÓN

II. COMITÉS DE ÉTICA

IV. AGRADECIMIENTOS

V. RESUMEN/ABSTRACT

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Esclerosis múltiple y modelos animales	1
1.1.1	Definición y epidemiología	1
1.1.2	Etiología	1
1.1.3	Variantes clínicas y severidad de la EM	3
1.1.4	Histopatología	4
1.1.5	Inflamación <i>versus</i> neurodegeneración	6
1.1.6	Modelos animales: encefalomiелitis experimental autoinmune	10
1.1.7	Tratamientos actuales e IFN- β	14
1.2	Células mieloides supresoras	17
1.2.1	Generalidades	17
1.2.2	Origen y maduración	19
1.2.3	Clasificación y nomenclatura	20
1.2.4	Mecanismos de inmunosupresión	22
1.2.5	MDSCs en EAE	25
1.2.6	MDSCs y neuroprotección	29
1.3	Oligodendroglía en EM y EAE	30
1.3.1	Desarrollo de la oligodendroglía	30
1.3.2	La oligodendroglía en patología: EM	32
1.3.3	Interacción entre los OPCs y células del sistema inmune	33
1.3.4	Estrategias de neuroprotección y remielinización.	36
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	41
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	46
3.1	Animales	46
3.2	Inducción y evaluación del modelo de EAE	48
3.3	Tratamiento con IFN- β	51
3.4	Citometría de flujo y cultivo de esplenocitos	51
	Procesado del bazo	51
	Marcaje de poblaciones esplénicas	52
	Aislamiento de MDSCs, cultivo y tratamientos	52
	Aislamiento de linfocitos T, cultivo y activación	54
	Ensayos de inmunosupresión en los co-cultivos de linfocitos T y MDSCs	55
3.5	Procesado de tejido nervioso para histología	56
3.6	Tinción de eriocromo cianina	58
3.7	Inmunofluorescencia	58

3.8	Detección de apoptosis en tejido mediante técnica de TUNEL	59
3.9	Aislamiento y cultivo de células precursoras de oligodendrocitos	60
3.10	Inmunocitoquímica	63
3.11	Cultivos organotípicos de rodajas de cerebelo	64
3.12	Técnicas de imagen y análisis	65
3.13	Análisis estadístico	69
4.	RESULTADOS	72
4.1	Modulación farmacológica de las MDSCs con IFN- β	72
4.1.1	La dosis única con IFN- β incrementa la presencia tanto periférica como en el sistema nervioso central de MDSCs	72
4.1.2	El tratamiento con IFN- β en ratones EAE induce el enriquecimiento de MDSCs con alta capacidad inmunosupresora en el infiltrado celular mielóide de la médula espinal	77
4.1.3	El tratamiento in vitro con IFN- β promueve la supresión de linfocitos mediada por MDSCs	82
4.1.4	El IFN- β mejora la actividad supresora de las MDSCs mediante el mantenimiento de su estado indiferenciado	86
4.2	Establecimiento de las MDSCs como indicadores de severidad en la EAE	89
4.2.1	Clasificación de la evolución clínica de la EAE y de datos clínicos	89
4.2.2	Relación de la riqueza esplénica de MDSCs con los datos clínicos y las poblaciones linfoides del bazo	91
4.2.3	El contenido periférico de MDSCs está relacionado con la apoptosis de linfocitos T en el SNC	94
4.2.4	La destrucción de mielina y el daño axonal están relacionados con el contenido esplénico de MDSCs	97
4.3	Efecto de las MDSCs sobre los OPCs y la mielina	101
4.3.1	Efecto de los factores solubles de las MDSCs sobre la biología de las células precursoras de oligodendrocitos	103
4.3.1.1	Supervivencia	103
4.3.1.2	Proliferación	104
4.3.1.3	Migración	105
4.3.1.4	Diferenciación	109
4.3.2	Efecto de los factores solubles de las MDSCs sobre el proceso de mielinización	111
5.	DISCUSIÓN	118
6.	CONCLUSIONES	135
7.	BIBLIOGRAFÍA	140

A microscopic image of neural tissue, likely a brain section, stained with a red fluorescent dye. The image shows a dense network of neurons and their processes, with the red staining highlighting specific cellular components. The background is dark, and the red structures are intricate and branching.

Introducción

1. Esclerosis múltiple y modelos animales

» Definición y epidemiología

La esclerosis múltiple (EM) es la enfermedad crónica inflamatoria, autoinmune y degenerativa del sistema nervioso central (SNC), caracterizada por ir asociada a patología de células de la glía (especialmente oligodendrocitos y sus precursores), junto con procesos de desmielinización, daño axonal, e inflamación y a día de hoy incurable. Es una enfermedad con un comienzo de síntomas temprano en la edad adulta, entre los 20 y los 40 años y afecta actualmente a alrededor de 2,3 millones de personas en todo el mundo y alrededor de 700.000 en Europa, convirtiéndose en la enfermedad crónica inflamatoria del SNC más prevalente del mundo desarrollado y representando una reducción de la esperanza de vida de 5 a 10 años (Browne et al., 2014; Sospedra y Martin, 2005). Cursa con afectación neurológica variable, de ahí la denominación de “múltiple” o más comúnmente, “la enfermedad de las mil caras”, y es la mayor causa de disfunción neurológica no traumática en adultos jóvenes. Como demuestra un estudio epidemiológico de 2008, el ratio de la incidencia de EM mujeres versus hombres es de 2,3 como ocurre en la mayoría de enfermedades consideradas autoinmunes, ratio que se ha visto incrementado

en la última década a 3 (Alonso y Hernan, 2008; Browne et al., 2014; Sospedra y Martin, 2005). Además, se ha observado una mayor agresividad de la enfermedad en el sexo masculino, con diferencias observables en el volumen cerebral. Sin embargo, cuando la enfermedad debuta en edades más tardías, entre los 45 y los 50 años, el ratio se iguala entre sexos y desaparecen las diferencias de volumen (Rojas et al., 2016). La EM tiene una mayor prevalencia e incidencia en Europa, Canadá, Estados Unidos, Nueva Zelanda y Australia, siendo menos común en Asia y en los trópicos y subtrópicos. En regiones de clima templado, la incidencia y prevalencia aumenta con la latitud (para una revisión, ver Ascherio y Munger, 2016). Asimismo, el riesgo de padecer EM varía en función de la raza, siendo mayor en blancos con ascendientes del norte de Europa, aunque dos recientes estudios apuntan a que la incidencia entre personas de raza blanca y negra se ha igualado, al menos en Estados Unidos. Aunque se desconoce el origen de este equilibrio se apunta a la disminución de los niveles de vitamina D en la población negra, factor ambiental de riesgo como se explicará más adelante (Ascherio y Munger, 2016).

» Etiología

La etiología de la EM es aún desconocida, aunque diferentes estudios han involucrado en la misma tanto predisposición genética como factores ambientales (Ascherio y Munger, 2016;

Reich et al., 2018; Sadovnick et al., 2017).

Entre los datos que apuntan a una contribución genética está el hecho de que la EM tiene una tasa de recurrencia familiar del 20 %, lo que supone que las personas con un familiar de primer grado afectado tienen entre un 2 y 4% más riesgo de EM (en contraposición con el 0,1% de la población general, Compston y Coles, 2008); y que la concordancia entre gemelos homocigóticos es de entre un 30 y un 50 % (Ascherio y Munger, 2016). De entre los 200 genes encontrados por estudios de asociación de genoma completo (*genome wide association studies*, GWAS por sus siglas en inglés) que confieren un mayor riesgo de afectación, la mayoría de ellos relacionados con vías de señalización de la respuesta inmune, los más significativos son los relacionados con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, o *human leukocyte antigen en humanos*, HLA), *hla-dr* y *-dq*, siendo el haplotipo HLA-DR15 el más común en pacientes de raza caucásica (Sospedra y Martin, 2005). Los genes asociados con este haplotipo comprenden citoquinas de la familia de TGF- β (*transforming growth factor*) y TNF (*tumor necrosis factor*), IL-1 (*interleukin 1*) y el antagonista del receptor de IL-1, CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen) y el receptor de estrógenos (Sospedra y Martin, 2005). Otros polimorfismos en genes como el receptor de quimiocinas 2 (C-C chemokine receptor type 2, *ccr2*), el receptor α de IL-10,

y el ligando de Fas (fas-L) se han propuesto como factores protectores; mientras que el receptor de quemoquinas 5 (C-C chemokine receptor type 2, *ccr5*), IL-10, el receptor α de IL-4, el receptor β de IL-2, el interferón γ (ifn- γ) y la vitamina D representan un factor de riesgo (Nielsen et al., 2017b). En cuanto a genes relacionados con el SNC, polimorfismos en genes como la proteína básica de mielina (*myelin basic protein*, *mbp*), la molécula de señalización Notch4, el factor neurotrófico ciliar (*ciliary neurotrophic factor*, *cnf*) y el factor activador de la esfingomielinasa neutra han sido relacionados con riesgo de desarrollo de EM. Además, también se ha encontrado asociación entre el alelo de la apolipoproteína E4 (ApoE4) con una mayor severidad/progresión de la enfermedad (Dyment et al., 2004).

La controversia que existe respecto a la contribución de factores genéticos a la etiología de EM, principalmente debido a la baja tasa de concordancia entre gemelos idénticos (Fagnani et al., 2015; McFarly, 1992), apunta a la contribución de factores ambientales. Entre los mayores riesgos ambientales podemos encontrar la latitud (con mayor incidencia en climas templados, como se ha descrito en el epígrafe anterior), con su correspondiente reflejo en una menor exposición solar y por lo tanto, producción de vitamina D, y en la exposición a patógenos propios de esas regiones geográficas. Además, otros factores como una dieta hipercalórica o el consumo de tabaco se consideran factores de

riesgo para la EM. La dieta y la composición de la flora intestinal bacteriana (microbioma) son objeto de un intenso estudio en los últimos años, derivado de estudios en modelos animales y en pacientes (Berer et al., 2017). Entre las infecciones que se asocian a la probabilidad de padecer EM se encuentra la mononucleosis por una infección temprana (durante la adolescencia) con el virus Epstein-Barr. Otros agentes infecciosos como otros herpesvirus y retrovirus, se han propuesto como los candidatos más apropiados para explicar la etiología de EM (Leibovitch y Jacobson, 2018). Entre los mecanismos que apoyan el origen viral de la EM se encontraría el mimetismo molecular y la interferencia con procesos que limiten la respuesta de células autorreactivas (Reich et al., 2018).

» Variantes clínicas y severidad de la esclerosis múltiple

La afectación neurológica en EM es variable y puede ser total o en forma de episodios de afectación parcial reversibles, durando entre días y semanas. Los principales signos clínicos incluyen pérdida de visión, disfunciones sensoriales y motoras, fatiga, cambios neurocognitivos, depresión, y pérdida de funciones urinarias, gastrointestinales y sexuales, entre otros, dependiendo de la zona del SNC afectada (Compston y Coles, 2008). Así, la pérdida de visión y/o visión monocular se deben a episodios de neuritis óptica, la debilidad en extremidades y pérdida sensorial a mielitis transversa, la visión doble a disfunción del tronco del encéfalo y la ataxia a lesión en el cerebelo.

Esta sintomatología se presenta dentro de cuatro formas evolutivas de la enfermedad (Figura 1). La mayoría de los pacientes debuta con un episodio agudo que afecta a una o varias zonas del SNC, lo que se conoce como “síndrome clínicamente aislado” (del inglés CIS, *clinically isolated syndrome*). A partir de este momento, la posibilidad de un segundo episodio se incrementa desde un 50 % a los dos años del CIS a un 82 % a los 20 años (Fisniku et al., 2008). Así, la variante más frecuente (un 85 %) de EM es la “remitente-recurrente” (EM-RR; Figura 1 A), con fases de incremento de la afectación neurológica (período recurrente) seguidos de períodos de desaparición total o parcial de los síntomas. Esta variante es dos veces más probable en mujeres que en hombres, es la más frecuente entre mujeres jóvenes de entre 25 y 30 años (Trapp y Nave, 2008; Zuvich et al., 2009), y presenta altos niveles de marcadores inflamatorios (Lassmann et al., 2011). Entre entre 10 y 20 años de debut de la enfermedad, la presencia de secuelas tras la recuperación de cada episodio es mayor, acumulándose la afectación. En estos casos (65 %) se desarrolla la variante “secundaria progresiva” (EM-SP; Figura 1B). En esta variante, el incremento de la afectación neurológica es constante. En un 10-15 % de los pacientes, el curso clínico se da con un incremento progresivo y crónico de los síntomas sin períodos de remisión, lo que se denomina variante “primaria progresiva” (EM-PP; Figura 1C (Trapp y Nave, 2008;

Zuvich et al., 2009). Esta variante aparece con una frecuencia igual en los dos sexos (Martin et al., 2016; Noseworthy et al., 2000). La edad de debut tanto para la variante EM-SP como EM-PP es de alrededor de 40 años (Compston y Coles, 2008; Confavreux y Vukusic, 2006b), exhiben bajos niveles de marcadores inflamatorios y responden de forma incompleta a terapias inmunomoduladoras. En el 5% restante de los pacientes, se da la variante “progresiva recurrente” que se caracteriza por un aumento progresivo de los síntomas junto con períodos de mayor incremento y remisión de los mismos al mismo tiempo (Figura 1D; Zuvich et al., 2009).

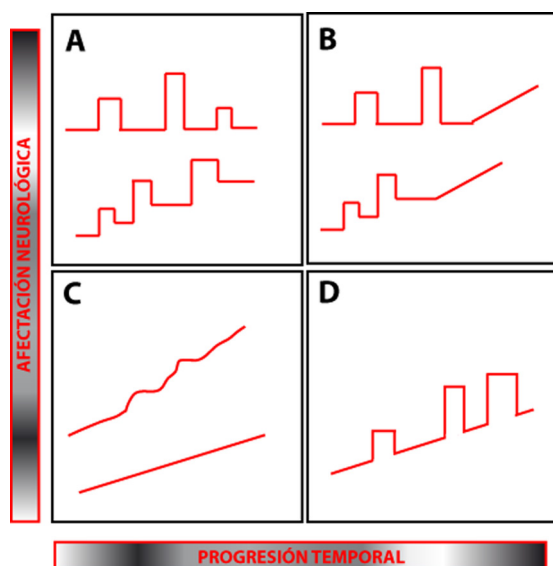


Figura 1. Variantes clínicas de la EM. A-D: Gráficos en los que se representa la evolución clínica respecto al tiempo en las variantes remitente-recurrente (A), secundaria progresiva (B), primaria progresiva (C) y progresiva recurrente (D). Adaptado de Zuvich et al., 2009.

» Histopatología de la esclerosis múltiple

La heterogeneidad encontrada tanto en la sintomatología como en las variantes clínicas

de la enfermedad está presente también en las alteraciones morfológicas que se observan con imagen por resonancia magnética (MRI, *magnetic resonance imaging*, por sus siglas en inglés) y en la evaluación histopatológica. La EM se caracteriza por la infiltración en el SNC de células del sistema inmune, la destrucción de mielina y la subsiguiente formación de placas escleróticas de contraste aumentado con MRI en la sustancia blanca de encéfalo y médula espinal. El daño tisular resulta de un compleja interacción dinámica entre las células del sistema inmune, células de la glía (principalmente oligodendrocitos y sus precursores, astrocitos y microglía) y neuronas (Reich et al., 2018), lo que cristaliza en una clasificación de las lesiones en función del contenido del infiltrado celular inflamatorio, compuesto por linfocitos (T y B) y macrófagos/microglía activados, la presencia de daño axonal, de gliosis reactiva y de capacidad de remielinización (Frohman et al., 2006a). Los tipos de lesiones encontradas en tejido *post mortem* de pacientes de EM se describen a continuación (y se encuentran resumidas en la Tabla 1).

◊ Lesión desmielinizante activa

Se distinguen por ser de pequeño tamaño, con márgenes difusos y generalmente localizadas alrededor de un vaso sanguíneo, con presencia de infiltrado perivascular, compuesto principalmente por linfocitos y macrófagos. La lesión puede mostrar un gran daño axonal, incluso con transección, junto con

una gran pérdida de mielina (Ferguson et al., 1997; Trapp et al., 1998). De hecho, se pueden observar macrófagos y microglía fagocíticos, con gran carga de mielina en el cuerpo celular. Sin embargo, permanecen axones que aún conservan la mielina o que han sido parcialmente remielinizados (Clemente et al., 2013).

El análisis de las lesiones activas apunta la existencia de distintos patrones de desmielinización, pero con uno solo predominante en cada paciente (Gold et al., 2006; Lucchinetti et al., 2000). Las placas del patrón I (presentes en un 15% de los pacientes) están caracterizadas por la presencia de linfocitos T y macrófagos asociados a destrucción de mielina. Las lesiones de patrón II (50% de los pacientes) están caracterizadas por la precipitación de inmunoglobulinas y proteínas del complemento en zonas de desmielinización activa, y una gran abundancia de zonas remielinizadas. Las lesiones de patrón III, presentes en alrededor de un 30% de pacientes, están caracterizadas por la presencia de oligodendrocitos apoptóticos, pérdida de la glicoproteína asociada a mielina (MAG, del inglés *Myelin Associated Protein*) y microglía activada, con una baja presencia e incluso ausencia de linfocitos T y proteínas del complemento. Por último, las lesiones con patrón IV, más raras (1% de los pacientes) se caracterizan por muerte no mediada por apoptosis de oligodendrocitos de la periplaca, probablemente como consecuencia de una disfunción metabólica primaria en este tipo

celular. Según esta clasificación, se podría pensar que en los patrones I y II la mielina sería la principal diana de un sistema inmune muy activo mientras que en las de patrón III y IV el desencadenante de los eventos que desembocan en la lesión parece ser una disfunción primaria de los oligodendrocitos (Barnett y Prineas, 2004; Franklin y ffrench-Constant, 2017).

◇ Lesión desmielinizante crónico-activa

Con un tamaño mayor que la lesión activa, en este tipo de lesión se pueden distinguir dos zonas concéntricas: placa (centro de la lesión) y periplaca (borde). En la periplaca se puede observar una acumulación de linfocitos, precursores de oligodendrocitos (en adelante OPCs, *oligodendrocyte precursor cells*, por sus siglas en inglés) (en adelante OPCs, *oligodendrocyte precursor cells*, por sus siglas en inglés) y macrófagos fagocíticos, lo que se podría asemejar a una lesión activa. Sin embargo, el centro de la lesión o placa tiene pocos infiltrados no perivasculares y los axones están desmielinizados. La desmielinización y el daño axonal es completo, aunque se puede observar remielinización parcial en la periplaca.

◇ Lesión desmielinizante crónico-inactiva

El tamaño de este tipo de placa es mayor, en gran parte debido a la confluencia con otras placas. Presenta una desmielinización completa y ausencia de OPCs. Los bordes están definidos y no presenta remielinización

Actividad de la lesión	Región	Características	Mielina OPCs/OLs	Sistema inmune innato	Sistema inmune adaptativo
Activa	Placa	- Márgenes difusos - Edema - Daño axonal	- Desmielinización - Reclutamiento de OPCs - Remielinización espontánea	- Microglía activada - Fagocitosis activa	- Infiltración de linfocitos T y B
En sombra	Placa	- Márgenes definidos - Baja densidad axonal	- Más del 60 % del área remielinizada	- Microglía quiescente - Ausencia de macrófagos	- Ausente
Crónico-activa	Placa	- Márgenes definidos - Axones desnudos -	- Desmielinización completa - Pocos OPCs - Ausencia de remielinización	- Poca fagocitosis	- Escasa infiltración de linfocitos
	Periplaca	- Daño axonal	- Desmielinización - Reclutamiento de OPCs - Remielinización espontánea	- Microglía activada - Fagocitosis activa	- Infiltración de linfocitos en los espacios de <i>Virchow-Robin</i>
Crónico-inactiva	Placa	- Márgenes definidos - Pocos axones desmielinizados - - Gran tamaño por confluencia de placas - Cicatriz glial	- Desmielinización completa - Ausencia de remielinización - Pocos OPCs	- Escasa activación microglial - Escasos macrófagos	- Infiltración ocasional de linfocitos

Tabla 1. Características histopatológicas de las lesiones de esclerosis múltiple. Adaptada de (Clemente et al., 2013).

en el centro ni en la periplaca. El centro de la lesión presenta lo denominado “cicatriz glial”, compuesta por astrocitos reactivos.

◊ Placa en sombra

Este tipo de lesión no presenta infiltrados celulares, y la remielinización es variable e incompleta en el interior de la lesión. Los bordes están definidos, hay menor densidad axonal y no se observa gliosis.

» **Inflamación *versus* degeneración**

La desregulación del sistema inmune que ocurre en la EM es multifactorial, y aunque en las últimas décadas se han empezado a acumular evidencias de la influencia de factores genéticos y ambientales, como se ha descrito en

el epígrafe anterior, el establecimiento del evento desencadenante y si éste es intrínseco o extrínseco al SNC está aún en intenso debate. Sin embargo, estudios en modelos animales de EM, así como el análisis de las poblaciones de células inmunes y sus productos en líquido cefalorraquídeo (LCR) y sangre de pacientes han desvelado un papel primordial de la respuesta inmune adaptativa (Kipp et al., 2012). Algunos autores consideran que la EM se inicia como un proceso inflamatorio que desarrolla un componente degenerativo de forma más tardía, el cual puede en última instancia progresar de forma independiente de la inflamación (Lassmann, 2011). Sin embargo, otros autores apuntan a una neurodegeneración primaria con un proceso

inflamatorio secundario (Trapp y Nave, 2008).

Como en otras enfermedades autoinmunes mediadas por células T (neuromielitis óptica y encefalomiелitis aguda diseminada), la EM ocurre en individuos genéticamente predispuestos cuyo sistema inmune, tras la exposición a factores ambientales, es activado frente a antígenos de mielina y entra en el sistema nervioso central cruzando la barrera hematoencefálica (BHE); Schiefenhover et al., 2017). Una vez allí, se produce su reactivación tras la presentación de antígenos de mielina por parte de las células presentadoras de antígeno o APCs (del inglés *antigen presenting cells*) residentes, lo que provoca el reclutamiento de más células del sistema inmune innato y la consiguiente destrucción de mielina y daño axonal (Figura 2; Goverman, 2009). El papel de los linfocitos T, tanto CD4⁺ efectores como CD8⁺ citotóxicos, en esta enfermedad viene dado por varias evidencias. En primer lugar, en pacientes de EM, la susceptibilidad genética viene dada principalmente por genes involucrados en la activación de las células T, como el HLA-DR y -Q (Martin et al., 1991; Wucherpfennig et al., 1994). En segundo lugar, las lesiones activas de EM están caracterizadas por la infiltración de células T reactivas a mielina, con linfocitos T CD4⁺ concentrados en las zonas perivasculares y linfocitos T CD8⁺ distribuidos ampliamente por el parénquima, siendo la población de linfocitos predominante en lesiones crónicas (Lassmann, 2014; Raine, 1994). En tercer lugar, linfocitos T CD4⁺ activados y reactivos a la proteína básica de mielina se han aislado de sangre periférica

de pacientes, presentando una alta expresión del receptor de IL-2, lo que es consistente con un fenotipo activado o de memoria (para una revisión ver Kaskow y Baecher-Allan, 2018). En cuarto lugar, fármacos que limitan el acceso de linfocitos T al SNC pueden reducir o prevenir la aparición de nuevas lesiones. Por último, y como se explicará en el siguiente epígrafe, los linfocitos T, y principalmente los CD4⁺, son los principales efectores en uno de los modelos animales más paradigmáticos de la EM, el modelo de encefalomiелitis experimental autoinmune (del inglés *experimental autoimmune encephalomyelitis*, EAE) en ratones y primates. De hecho, está descrita la generación de este modelo en ratones transgénicos humanizados que expresan tanto HLA-DR como -DQ (Das et al., 2000).

Por otra parte, existen evidencias que apuntan a un papel importante de los linfocitos B en la patología de la EM, reforzadas por la existencia de terapias que deplecionan los linfocitos B y que limitan el progreso de la enfermedad (Montalban et al., 2017). Además, se sabe que el LCR de pacientes de EM presenta bandas oligoclonales únicas, lo que apunta a una importante función de la producción de autoanticuerpos en el SNC por parte de los linfocitos B (Villar et al., 2005). Sin embargo, la rapidez con la que los fármacos que deplecionan esta población celular actúan hace pensar en la participación de otros mecanismos de acción, como la presentación de antígeno a linfocitos T o la producción de citoquinas.

Sin embargo, el mecanismo por el cual se produce la activación inicial de los linfocitos T autorreactivos y su posterior reactivación

durante los brotes clínicos es aún desconocido. Recientemente, se ha descrito la reactivación de los linfocitos T infiltrados activados no sólo frente a antígenos de mielina como MOG (del inglés *myelin oligodendrocyte glycoprotein*) sino también frente a una proteína de los neurofilamentos (del inglés *neurofilament-medium*, NF-M), proteína de filamentos intermedios expresada por las neuronas (Ramadan et al., 2016). Varios autores apuntan a una activación en el sistema inmune periférico, ya que las células del SNC presentan una baja expresión de moléculas HLA. Además, los linfocitos T CD4⁺ necesitan estar activados previamente para poder cruzar la BHE. Los principales mecanismos propuestos para la activación de los linfocitos T en el sistema inmune periférico son: i) el mimetismo molecular, es decir, reactividad cruzada entre antígenos propios y agentes extraños durante la selección y expansión clonal de linfocitos T en el timo; ii) la activación basal, es decir, la generación de linfocitos T autorreactivos por una inflamación generalizada no específica durante algún proceso infeccioso; y iii) ambas (Sospedra y Martin, 2005).

Por otra parte, cada vez existen más evidencias de la participación de la respuesta inmune innata en la patogénesis de la EM, aspecto que se tratará con más detalle en siguientes epígrafes de este apartado. Las evidencias provienen de la presencia de macrófagos en los infiltrados celulares de las lesiones, ya sea con función proinflamatoria (activación clásica) o regeneradora/reparadora (activación alternativa; Mishra y Yong, 2016). La microglía, las células

fagocíticas del SNC, son abundantes también en las lesiones de EM (Prinz et al., 2011).

La ausencia de un agente ambiental iniciador de la enfermedad ha redirigido la investigación en EM hacia la interacción axón-vaina de mielina y la posibilidad de una afectación inicial en el SNC, con independencia de procesos inflamatorios. Las evidencias de este postulado provienen de la histopatología, en la que se observa placas de desmielinización en la corteza de pacientes sin infiltración de células inmunes (que sí se ven en las lesiones de sustancia blanca); y de la MRI, en la que la aparición de nuevas lesiones sí correlaciona con la sintomatología en la EM-RR pero no así en las fases progresivas, en las que hay aumento de síntomas pero ausencia de nuevas lesiones (Katz et al., 1993; Lassmann, 2011). Se ha postulado que se produciría una salida del antígeno con origen en el SNC a través de los nervios craneales, principalmente por los nervios olfatorios, hacia los ganglios linfáticos cervicales. Ahí se produciría la presentación antigénica a los linfocitos T. De hecho, el porcentaje de estas células en los ganglios linfáticos se correlaciona directamente con la afectación neurológica (van Zwam M. et al., 2009).

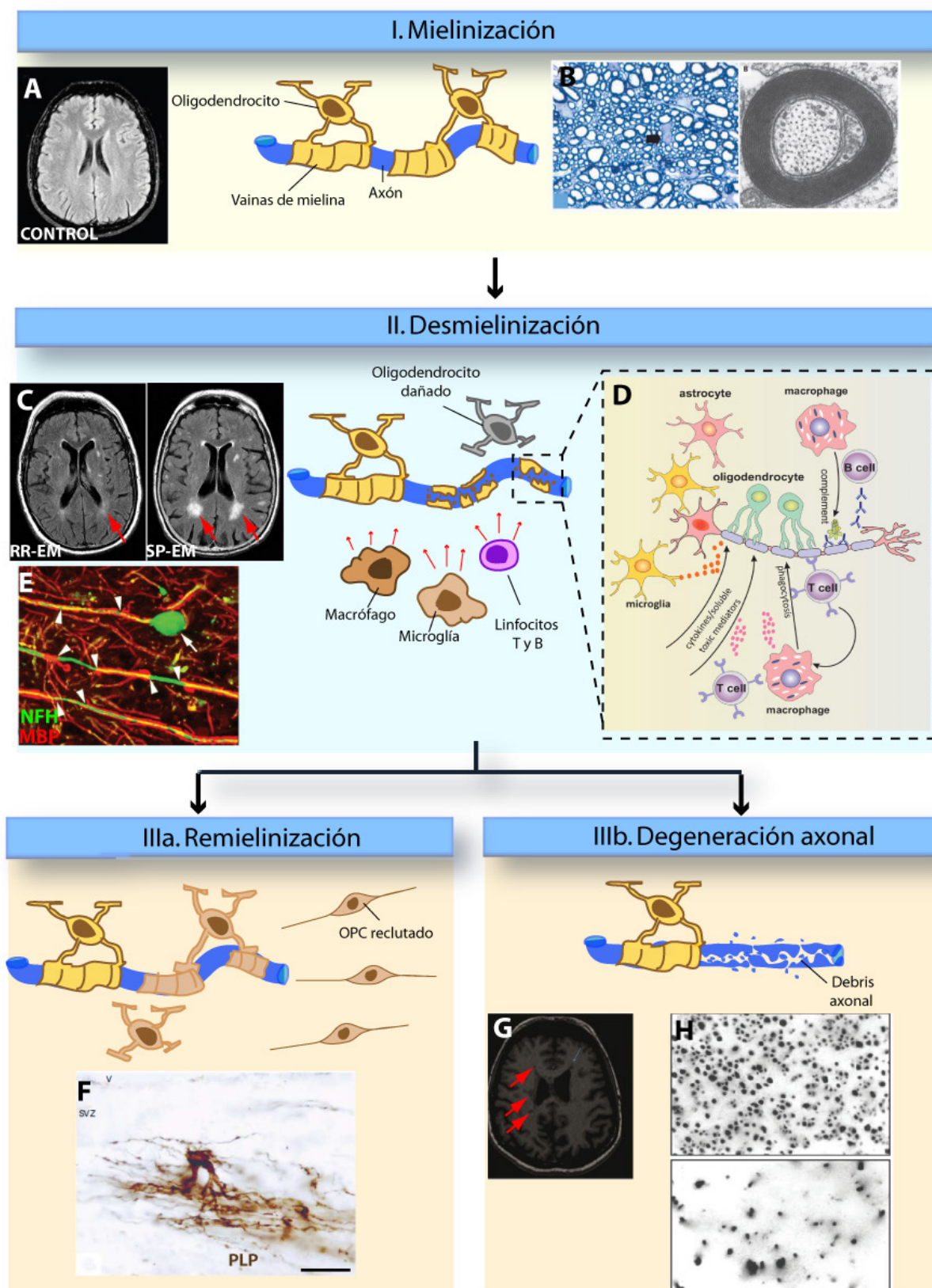


Figura 2. Hipótesis sobre la desmielinización en EM. I: En un sujeto sano (A; (Trapp and Nave, 2008), los axones se encuentran recubiertos por la vaina de mielina que producen los oligodendrocitos, formada por

la sucesión de vueltas de su membrana plasmática alrededor del axón. Se observa la morfología de la mielina en microscopía óptica, teñida en azul de toluidina, y microscopía electrónica (B; (Frohman et al., 2006a). II: La presencia de placas por MRI (D) refleja la activación patológica de las células del sistema inmune que desemboca una respuesta tanto innata como adaptativa (D; Elieh Ali Komi D. and Grauwet, 2017) que conlleva la destrucción de la mielina, pudiendo permanecer el axón intacto en primera instancia (E; (Trapp and Nave, 2008). IIIa: En un escenario subsecuente de remielinización, se produce el reclutamiento y activación de OPCs, los cuales se diferencian a oligodendrocitos mielinizantes y recubren nuevamente el axón, aunque de manera incompleta (E; (Chang et al., 2002). IIIb: En ausencia de remielinización, la exposición prolongada del axón desnudo conduce a su degeneración, lo que se refleja en las llamadas placas de “agujero negro”, señaladas por las flechas rojas (F; (Giannetti et al., 2014) y en una disminución de la densidad axonal en tejido post-mortem (G; (Trapp and Nave, 2008).

» Modelos animales de EM: Encefalomiелitis Autoimmune Experimental

Aunque ningún modelo animal ha sido capaz hasta ahora de reproducir los mecanismos subyacentes a una enfermedad tan compleja como la EM, se han utilizado varios de ellos, tanto virales como autoinmunes (Figura 3). Entre los modelos virales, que intentan reproducir el postulado del origen infeccioso de la enfermedad, el más utilizado es la enfermedad desmielinizante inducida por la infección con el virus de Theiler (TMEV-IDD, *Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus-Induced Demyelinating Disease*, en inglés; (Benner et al., 2016; Mecha et al., 2013) utilizando la cepa de ratón SJL/J. Este modelo cursa con una fase aguda de encefalomiелitis, seguida de una remisión y una segunda fase de aumento progresivo de los síntomas, asimilando el curso clínico de la variante primaria progresiva de la EM (EM-PP). Este modelo reproduce varias de las características de la EM, como son el daño axonal y la neuroinflamación presente sobre todo en la fase aguda, el proceso de mimetismo molecular entre epítomos propios de mielina y epítomos virales, la presencia de patología tanto cerebral como espinal y una inhibición de los procesos de remielinización

(Mecha et al., 2013; Melero-Jerez et al., 2016).

Sin embargo, el modelo más utilizado para el estudio de la EM es la EAE. Este modelo refleja en buena medida el componente autoinmune de la EM y se basa en la neuroinflamación provocada por la infiltración de linfocitos T CD4⁺ autorreactivos contra antígenos de mielina al SNC (neuroantígenos), con la subsiguiente destrucción de mielina y afectación de los axones desnudos, lo que se refleja en un curso clínico con parálisis progresiva en sentido caudo-rostral (Gold et al., 2006; Miller and Karpus, 2007). La inducción de la enfermedad se puede realizar de forma activa (inoculación de péptidos de mielina) o pasiva (transplante de linfocitos T autorreactivos específicos de antígenos de mielina; (Archie Bouwer et al., 2015; Gold et al., 2006).

Los orígenes de la EAE datan de la década de 1920, cuyo se utilizaban homogenados de proteínas del SNC para reproducir la encefalitis asociada a la vacuna contra la rabia (Koritschoner y Schweinburg 1925) . Sin embargo, su utilidad se vio reducida debido a la baja incidencia y la heterogeneidad de la sintomatología. Es por ello que se introdujeron dos factores que

solucionaron estos problemas: i) el coadyuvante de Freund (CFA, *Complete Freund's Adjuvant* en inglés; (Libbey and Fujinami, 2011) o el adyuvante incompleto de Freund suplementado con partículas de *Mycobacterium tuberculosis* inactivadas, que activa el sistema inmune y facilita la sensibilización frente al antígeno; y ii) la toxina pertúsica, que permeabiliza la BHE, y facilita la activación de las APCs y el reconocimiento de los antígenos de mielina por parte de los linfocitos T autorreactivos (Hofstetter et al., 2002; Hofstetter et al., 2007; Miller and Karpus, 2007).

La EAE se puede generar con diferentes neuroantígenos en diferentes cepas y especies, lo

que da lugar a una variedad de cursos clínicos (Figura 3C). Uno de los más utilizados es la glicoproteína MOG (Berard et al., 2010), capaz de producir no sólo la inducción de linfocitos T autorreactivos en las especies genéticamente susceptibles, sino de inducir una respuesta desmielinizante dependiente de autoanticuerpos (Gold et al., 2006). Además, otros neuroantígenos provienen de la proteína proteolipídica (PLP, *Proteolipid Protein*, en inglés) y la proteína MBP (Pettinelli et al., 1982; Tuohy et al., 1988).

Cuyo se utiliza MBP en ratones de la cepa B10.PL y PL/J para inducir la EAE, se genera una enfermedad monofásica en la

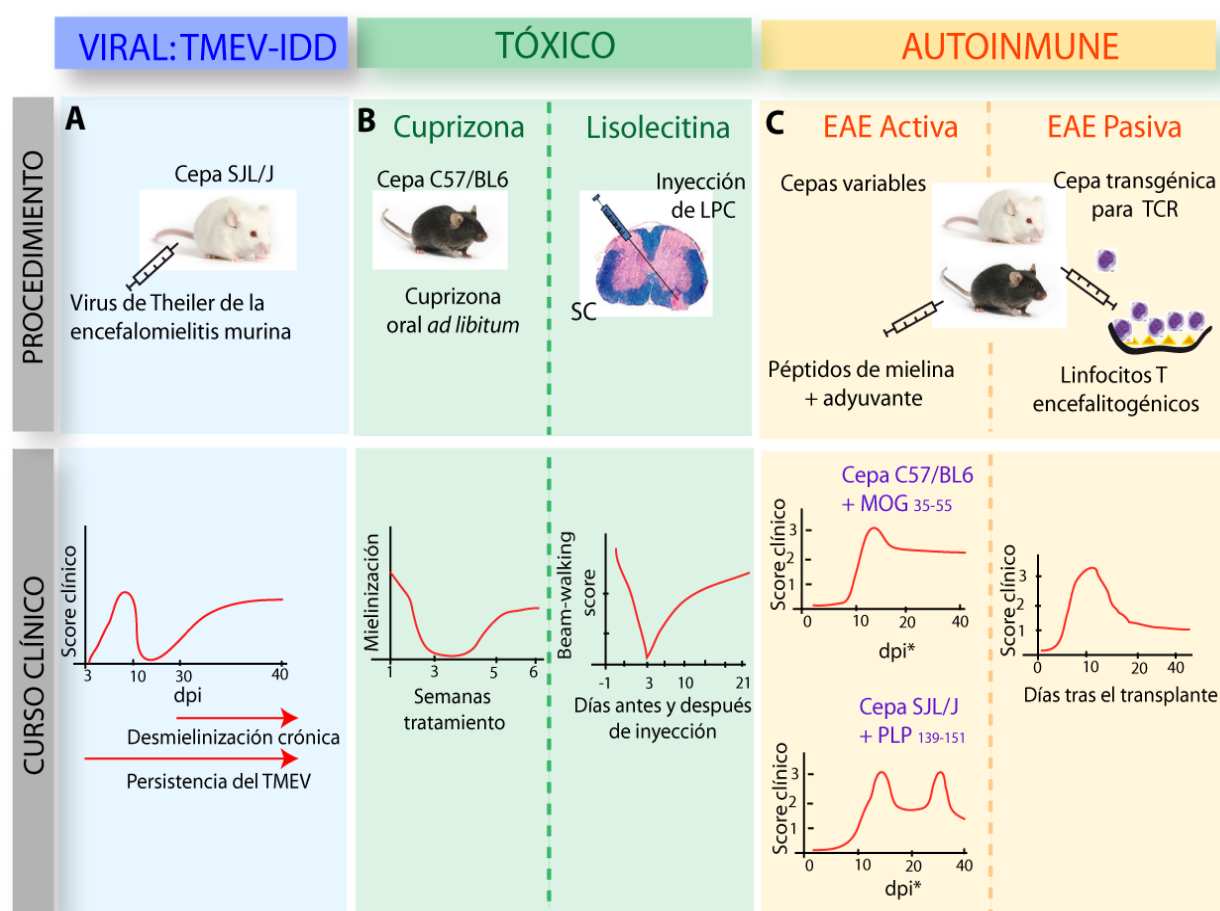


Figura 3. Modelos animales de EM. A: Modelo viral generado mediante la inyección del virus de Theiler, donde se observa una fase aguda de encefalitis seguida de una fase de remisión de síntomas y un posterior aumento progresivo de los síntomas. B: La utilización de toxinas como la cuprizona (administrada por vía oral) o la lisolecitina (por inyección estereotáxica), da lugar a cursos clínicos en los que predominan los procesos de desmielinización. C: Variantes de la EAE activa y pasiva, con las cepas y cursos clínicos más usados. Mientras que la EAE activa consiste en la inmunización con péptidos de mielina para provocar una respuesta autoinmune, la variante pasiva consiste en la inoculación de linfocitos T pre-sensibilizados frente a antígenos de mielina *in vitro*. Abreviaturas: dpi= días post-infección; dpi*= días post-inmunización; SC= spinal cord, en inglés (médula espinal). Para el resto de abreviaturas, referirse al texto.

que los ratones tienen un episodio recurrente-remittente breve y una recuperación posterior total (Miller and Karpus, 2007). En ratones de la cepa SJL, la inducción de la EAE mediante la utilización de PLP induce un curso clínico recurrente-remittente (Hofstetter et al., 2002). Por otra parte, la inducción con el péptido MOG₃₅₋₅₅ en ratones de la cepa C57BL/6 puede producir un curso clínico recurrente-remittente, monofásico o multifásico, y/o un curso crónico, dependiendo de la concentración de antígeno, de *Mycobacterium tuberculosis* del adyuvante y la toxina pertúsica (Berard et al., 2010; Hasselmann et al., 2017). Recientemente, nuevos protocolos han demostrado ser efectivos en la inducción de la EAE en ratones de la cepa C57BL/6, como la inmunización con la proteína de fusión de MBP y PLP, denominada MP4, generyo un curso crónico (Kuerten et al., 2006; Prinz et al., 2015).

La EAE activa consta de dos fases: la fase de inducción y la fase efectora. La primera consiste en la sensibilización en los órganos linfoides de los linfocitos T con el antígeno inoculado, con la consiguiente expansión clonal. Durante la fase efectora de la enfermedad, que se desarrolla en términos generales a partir de los 9-12 días tras la inmunización (dpi; días post-inmunización) se

suceden varios eventos que involucran el sistema inmune. En primer lugar, tras la activación periférica de los linfocitos T CD4⁺, se produce su migración a través del torrente sanguíneo y su extravasación al parénquima nervioso a través de la BHE. Y en segundo lugar, se produce el reclutamiento de monocitos y macrófagos debido la producción de factores solubles por parte de los linfocitos, lo que conlleva la destrucción de mielina, en parte por la actividad fagocítica y en parte por los factores citotóxicos secretados (Miller and Karpus, 2007).

» Factores relacionados con la severidad de la EM

Un capítulo aparte merece la relación entre la agresividad de la enfermedad, la capacidad de remielinización y los agentes celulares involucrados en su control. La imposibilidad de acceder al tejido del SNC en los momentos previos al desarrollo de lesiones cyidatas a pertenecer a un cuadro de EM, junto con la complejidad de los mecanismos involucrados ha dificultado hasta ahora el establecimiento de buenos biomarcadores de progresión de la enfermedad. Tanto la cantidad como la eficacia de la remielinización espontánea en paciente

es variable y no está asociada a edad de debut, sexo, duración de la enfermedad, estadio del tratamiento ni forma evolutiva (El Behi M. et al., 2017; Patani et al., 2007). A día de hoy, la única técnica que permite obtener datos directos de desmielinización así como de disfunción de la BHE, es la MRI, sobre todo en estadios tempranos de la enfermedad (Fournier et al., 2017). Las observaciones derivadas de la aplicación de esta técnica, aplicada según protocolos establecidos, permite no sólo el diagnóstico sino la predicción hasta cierto punto de la progresión de las lesiones y el grado de efectividad de los tratamientos modificadores de la enfermedad o DMTs (del inglés *disease modifying treatments*, (Rovira et al., 2015; Thompson et al., 2018). De hecho, existe una correlación inversa entre el índice de remielinización, extraído del uso de marcadores de MRI, y el grado de afectación neurológica (Bodini et al., 2016). Sin embargo, los biomarcadores convencionales de MRI no han mostrado una correlación lo suficientemente robusta a nivel poblacional, probablemente debido a la heterogeneidad inherente a la EM. El desarrollo en los últimos años de nuevas técnicas de imagen, como el MRI de 7 teslas, la tomografía de emisión de positrones (PET, *positron-emission tomography* en inglés) o la tomografía por coherencia óptica (OCT, *optical coherence tomography* en inglés) ha permitido el estudio de diferentes aspectos de la patología de la EM, como la inflamación perivascular, la aparición

de lesiones en el SNC, la pérdida y recuperación de mielina, la activación de la respuesta inmune innata, la inflamación de las leptomeninges y la función neuronal (Absinta et al., 2016).

Por otra parte, el uso de diferentes escalas de evaluación de la progresión de la enfermedad resulta incompleto para predecir la progresión de la enfermedad. La escala más utilizada es la EDSS (del inglés *expanded disability status scale*), que evalúa la afectación neurológica con valores del 0 al 10. Esta escala se vio mejorada con la introducción de la duración de la enfermedad en la denominada escala MDSSS (*EDSS-based EM severity score*). Sin embargo, la dificultad para establecer de forma objetiva el debut de la enfermedad la convierte en un método inexacto. Otras escalas, como la CombiWISE (*combinational weight-adjusted disability score*) o la ARRMS (*age-related EM severity score*) han tratado de abordar la evaluación clínica de la EM (Kosa et al., 2016; Manouchehrinia et al., 2017). Recientemente, se ha descrito un nuevo método que mejora las dos escalas anteriores, la escala EM-DSS (*EM disease severity scale*). Los autores la proponen como una herramienta para establecer correlaciones entre fenotipo y genotipo, identificar los procesos biológicos subyacentes a la progresión de la EM y mejorar la elección de la terapia adecuada (Weideman et al., 2017).

Por otra parte, la búsqueda de factores moleculares o celulares que permitan determinar la evolución de la enfermedad se encuentra entre las prioridades de la medicina moderna como

el paso clave para el tratamiento personalizado.

La existencia de períodos de remisión de los síntomas, con la consiguiente remielinización parcial de las lesiones y otras evidencias extraídas de la histopatología de la EM y del modelo animal de EAE, aportan las claves para postular la existencia de mecanismos reguladores endógenos de tolerancia periférica que restauren la homeostasis del sistema inmune.

Varios estudios han demostrado la necesidad de un ambiente anti-inflamatorio que permita la activación de los mecanismos de remielinización. Entre los tipos celulares relacionados con este proceso se encuentran macrófagos y microglía. La polarización de estas células desde un fenotipo “M1” (proinflamatorio) hacia un fenotipo antiinflamatorio/reparador “M2” (se usa esta clasificación como términos de conveniencia, asume la existencia de una gran plasticidad y de fenotipos intermedios; McMurran et al., 2016). Esta idea se ve reforzada por el hecho de que, en pacientes de EM la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (IFN- γ , TNF- α , IL-2) en el SNC y el LCR se correlaciona con el aumento de la afectación clínica, mientras que las fases de remisión se asocia a la expresión de citoquinas anti-inflamatorias (IL-4, IL-5, IL-13 e IL-25; Fitzgerald et al., 2007; Gutcher and Becher, 2007; Heeger et al., 2000; Kuchroo et al., 2002). Además, el estudio de tejido *post-mortem* de lesiones crónico-activas revela un fenotipo pro-inflamatorio en la microglía y macrófagos (Koning et al., 2007; Vogel et al., 2013). La

relación causal entre la presencia de monocitos y el inicio de la enfermedad ha sido ampliamente estudiada, y se ha visto que la depleción de monocitos inflamatorios previene el debut de la EAE. Mientras un ambiente M1 parece vital en las fases iniciales de la remielinización por la promoción de la proliferación y migración de OPCs a los sitios de lesión (Arnett et al., 2003; T aylor et al., 2010) existen evidencias de que un ambiente M2 promueve la diferenciación de los OPCs hacia oligodendrocitos mielinizantes (Butovsky et al., 2006b; Butovsky et al., 2012; Miron et al., 2013; Miron and Franklin, 2014). Además, se ha visto que la depleción de macrófagos/microglía (Kotter et al., 2001; Kotter et al., 2005; Miron and Franklin, 2014) conlleva una peor remielinización. Como se ha visto en un estudio reciente, los linfocitos de pacientes de EM controlan la capacidad de remielinización a través de la modulación de la microglía activada (El Behi M. et al., 2017), lo que revela una capacidad intrínseca de cada paciente (vista también en Patrikios et al., 2006) para coordinar la reparación de la mielina basada en el perfil de secreción de sus linfocitos. De esta forma, se abre la posibilidad de clasificar la evolución de los pacientes en función de su capacidad de remielinización, la cual se encuentra relacionada con la respuesta adaptativa de cada individuo.

» Tratamientos actuales de la EM: IFN- β

Los tratamientos actuales para la EM son sólo inmunomoduladores, centrados en disminuir

la inflamación asociada a las placas activas. Sin embargo, la contribución que estos tratamientos puedan tener directa o indirectamente sobre los mecanismos de reparación/regeneración de mielina es aún desconocida.

A día de hoy, existen 15 tratamientos aprobados para modificar la progresión de la variante EM-RR (recogidos en la Figura 4): 5 preparaciones de interferón beta (IFN- β), 2 preparaciones de acetato de glatirámico; los anticuerpos monoclonales natalizumab, alemtuzumab y ocrelizumab; el agente

para mejorar la velocidad de marcha en los pacientes de EM (Reich et al., 2018). Estos tratamientos se dirigen contra mecanismos pro-inflamatorios del sistema inmune como la migración e infiltración de linfocitos T en el SNC, la activación de las APCs o la producción de auto-anticuerpos. Recientemente se ha probado la eficacia del anticuerpo monoclonal ocrelizumab en la variante primaria progresiva de la EM (Montalban et al., 2017).

Por otra parte, existen estudios de inmunoadablación seguida de trasplante de

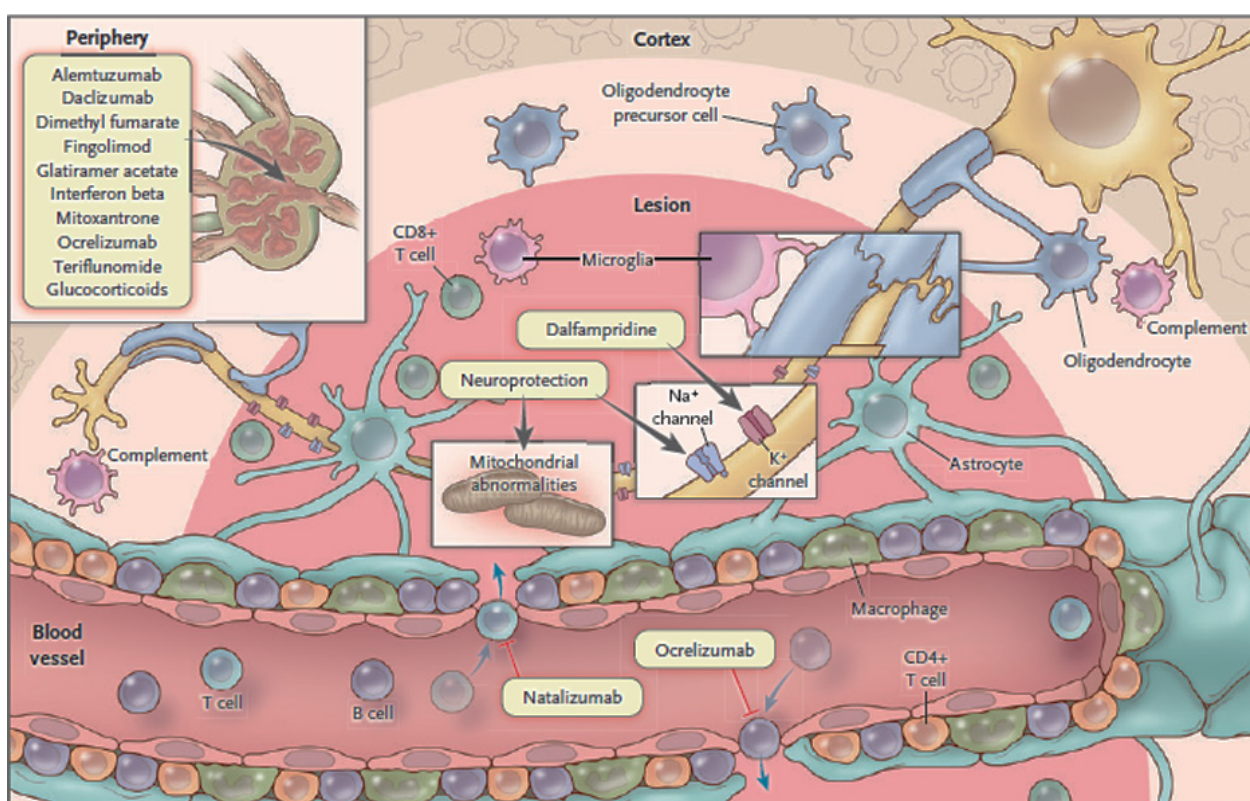


Figura 4. Tratamientos en EM. Ilustración en la que aparecen algunos de los tratamientos utilizados actualmente para la EM. De (Reich et al., 2018).

quimioterapéutico mitoxantrona; y los agentes orales basados en pequeñas moléculas fingolimod, dimetilfumarato y teriflunomida. A ellos se les une la dalfampridina como tratamiento sintomático

células madre hematopoiéticas, con resultados prometedores (Muraro et al., 2017). Otros esfuerzos están dirigidos hacia la inhibición específica de linfocitos B y T, así como a la

limitación de la respuesta innata (Kwong et al., 2017; Segal et al., 2008). Sin embargo, a día de hoy ninguno de estos estudios ha resultado en una atenuación de la progresión de la enfermedad.

Más allá de los tratamientos inmunomoduladores existen otras estrategias actualmente en estudio que se centran en la reparación y protección del tejido del SNC. Entre ellas se encuentran el trasplante de OPCs y NPCs (*neural precursor cells*, en inglés), o las estrategias para la protección de axones (Nandoskar et al., 2017). Por último, un reciente estudio publicado en 2017 describe el primer tratamiento, denominado fumarato de clemastina (aprobado con uso antihistamínico) que se ha demostrado eficaz en la promoción de la remielinización, analizada mediante potenciales visuales evocados (Green et al., 2017).

Entre los tratamientos nombrados al principio de este epígrafe, y el primero en ser descrito como fármaco modulador de la EM se encuentra el IFN- β (1993). Desde entonces, se ha utilizado durante años como tratamiento de primera línea, aunque ha sido relegado a una segunda opción en los últimos años en un tercio de los pacientes, debido a alta tasa de no-respuesta y a los efectos secundarios (de Jong et al., 2015; Prinz et al., 2008). Varios motivos se han postulado para explicar que no funcione el tratamiento, entre ellos un alto nivel de IFN- β endógeno que impide una sensibilización mayor de los receptores tras el aporte de IFN- β exógeno, la existencia de receptores de IFN- β soluble que

se unan al IFN- β inyectado, y la existencia de anticuerpos anti-IFN- β (Hurtado-Guerrero et al., 2017). Sin embargo, en los pacientes con EM-RR respondedores, el IFN- β reduce la frecuencia de los episodios sintomáticos en alrededor de un 35 %, reduce las lesiones observadas con MRI y retrasa la progresión de la afectación neurológica (Comi et al., 2001). Si bien en humanos el mecanismo de acción es parcialmente conocido, sus efectos en la EAE han sido ampliamente estudiados (para una revisión pormenorizada sobre los actividad inmunomoduladora del IFN- β ver Kasper and Reder, 2014; Galligan et al., 2010; Suardíaz et al., 2016). A modo de resumen, el IFN- β reduce la proliferación de linfocitos T CD4⁺ autorreactivos contra epítomos de mielina (Galligan et al., 2010), disminuye la infiltración de células inflamatorias en el SNC mediante la preservación de la BHE (Stone et al., 1995), interfiere en la producción de metaloproteinasas de la matriz extracelular (Mastronardi et al., 2004; Waubant et al., 2003), reduce la producción de citoquinas proinflamatorias como IFN- γ por parte de los linfocitos T CD4⁺ (Noronha et al., 1993), inhibe la polarización hacia Th17, induce el viraje funcional hacia el fenotipo Th2 (Kozovska et al., 1999) y modifica el perfil de expresión de citoquinas y quimiocinas durante la EAE (Galligan et al., 2010; Martín-Saavedra et al., 2007; Sweeney et al., 2011).

Entre las células del sistema inmune que representan una diana para el IFN- β producido

de forma endógena, además de los linfocitos T, se encuentran las células mieloides. Diversos estudios han desentrañado los efectos que el IFN- β y los interferones de tipo I en general tienen sobre las diferentes poblaciones de células mieloides tanto durante el proceso hematopoiético como en condiciones patológicas (Sonda et al., 2011); para una revisión, ver (Brendecke and Prinz, 2012). De hecho, defectos en uno de los dos componentes del receptor de IFN- β , el IFNAR1, en las células mieloides da lugar a una EAE más severa con fase efectora más acusada y mayor letalidad (Prinz et al., 2008). Es interesante recalcar que los monocitos y macrófagos y su equivalente en el SNC, la microglía, son las células con un papel más relevante en la inmunidad del SNC, en una manera dependiente de IFNAR1. Es más, los procesos intracelulares de fagocitosis tienen lugar mediante señalización a través de IFNAR (Prinz et al., 2008).

2. Células supresoras derivadas de mieloides

» Generalidades

Entre los agentes celulares responsables del control de la respuesta inmune en contextos inflamatorios, las células mieloides supresoras (en adelante, MDSCs, del inglés *myeloid-derived suppressor cells*) representan una población emergente cada vez más reconocida en diferentes patologías. Las MDSCs constituyen una población multipotente de origen mieloides, con morfología y fenotipo heterogéneo, que

comprende progenitores mieloides y células mieloides inmaduras (IMCs, *immature myeloid cells*, del inglés). Además, las MDSCs se caracterizan por su capacidad para suprimir la respuesta inmune a diferentes niveles, como se desarrollará a lo largo de este epígrafe, y por su gran plasticidad (Zhu et al., 2011).

Los primeros estudios que señalaron la presencia de unas células de naturaleza mieloides con alta capacidad supresora relacionadas con la progresión de tumores se remontan a principios de los años 70 (para una revisión de la historia de esta población, ver Talmadge and Gabrilovich, 2013). Durante los años 80 y 90, datos crecientes apuntaban a la presencia de una población heterogénea de células mieloides supresoras (Buessow et al., 1984; Seung et al., 1995; Young et al., 1987b), y no fue hasta finales de los años 90, hace apenas 20 años, que se describió la naturaleza inmadura de estas células al presentar marcadores tanto de linaje monocítico (CD11b) como granulocítico (Gr-1; Gabrilovich et al., 1998). Fue en 2007, y en el intento de agrupar la heterogeneidad de estas células en una denominación común, cuyo se decidió nombrar a esta población como células supresoras derivadas de mieloides o células mieloides supresoras (MDSCs; Gabrilovich et al., 2007), basándose en su origen mieloides común y su principal característica funcional, la capacidad inmunosupresora. Las MDSCs carecen de la expresión de marcadores de superficie que son específicamente de macrófagos (F4/80) o células dendríticas (CD11c), y se

pueden clasificar en dos subcategorías en base a su fenotipo y morfología, según sean similares a neutrófilos (la población denominada PMN-MDSCs, o MDSCs polimorfonucleares) o a monocitos (denominadas M-MDSCs, o MDSCs monocíticas; Youn and Gabrilovich, 2010).

En los últimos años, numerosos estudios han demostrado el papel deletéreo de esta población celular frente a los de tumores (Nagaraj et al., 2009; Ouzounova et al., 2017). Sin embargo, cada vez existen más referencias del papel que juegan en otras patologías con componente inflamatorio como pueden ser infecciones por parásitos (Ouzounova et al., 2017), tolerancia frente a transplantes (Koehn and Blazar, 2017; Messmann et al., 2015; V endramin et al., 2014), inflamación crónica (Perfilyeva et al., 2017), estrés traumático

(Saiwai et al., 2013) y enfermedades autoinmunes (Bowen and Olson, 2009; Cripps et al., 2010; Cripps and Gorham, 2011; Iwata et al., 2010; Marhaba et al., 2007; Slaney et al., 2011; Yin et al., 2010), especialmente del SNC (Ioannou et al., 2012; King et al., 2009; Mildner et al., 2009; Moliné-Velázquez et al., 2011; Moliné-Velázquez et al., 2014; Zhu et al., 2007; Zhu et al., 2011).

Sin embargo, “como a menudo ocurre con los adolescentes, las MDSCs periódicamente experimentan una crisis de identidad y una relación complicada con el resto de células establecidas en el campo” de la inmunología (tomado de Gabrilovich, 2017). A lo largo de este trabajo se explicarán los aspectos más importantes de esta población celular y se aportarán nuevos datos que establecen un lugar definido para su actuación en episodios inflamatorios.

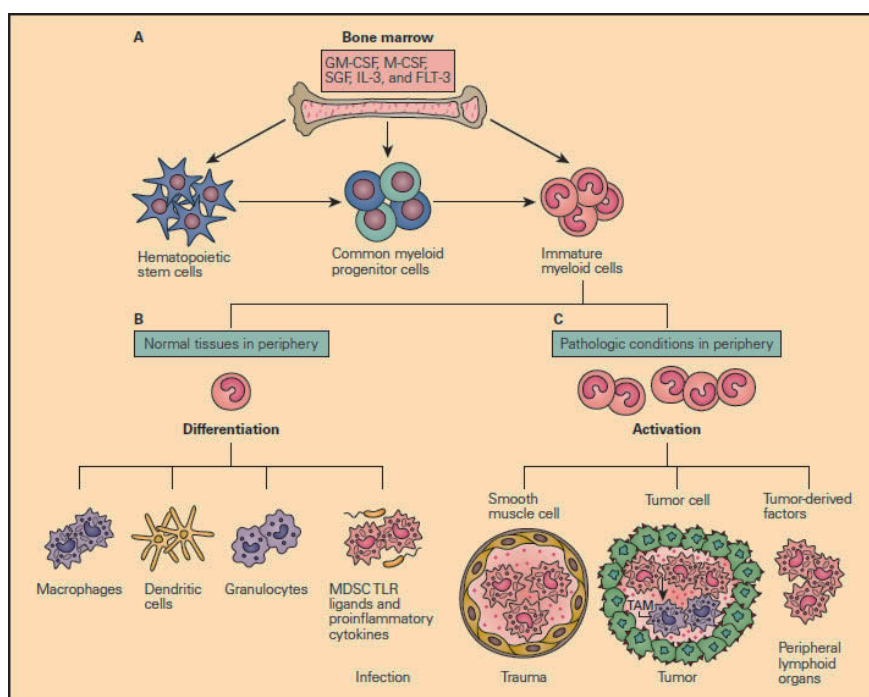


Figura 5. Hematopoyesis normal y en condiciones patológicas. A: Producción de HSC en la médula ósea, lo que da lugar a CMPs y después de IMCs, que migran a los tejidos diana. B: Diferenciación de las IMCs en condiciones normales. C: Diferenciación de las IMCs en condiciones patológicas. Abreviaturas: CMP= *common progenitor cells*; HSC= *hematopoietic stem cell*; IMC= *immature myeloid cell*. Modified from (Gabrilovich and Nagaraj, 2009) by immunopaedia.org.

» Origen y maduración

Las MDSCs forman parte de los sistemas supresores naturales, definidos desde hace tres décadas como agrupaciones celulares que existen en estados de inmunodeficiencia como pueden ser rechazo a trasplantes (del inglés *graft versus host disease*, GVHD), recuperación tras irradiación y desarrollo neonatal (Cleveland et al., 1988) .

Durante el proceso hematopoiético (Figura 5), las células madre hematopoiéticas (HSC, *hematopoietic stem cells*, en inglés) se diferencian a células progenitoras mieloides (CMP, *common myeloid progenitors*), y éstas a IMCs, sin propiedades supresoras (Young et al., 1987a), alcanzando un porcentaje de entre 20-30 % en la médula ósea y de un 2-4% en el bazo (Zhu et al., 2007).

Este proceso está controlado por una compleja red de factores que incluyen citoquinas como el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF, *macrophage colony-stimulating factor*), la interleukina IL-3 (Apolloni et al., 2000; Bronte et al., 2000), y moléculas de señalización intracelular como la proteína tirosín-quinasa 3 parecida a FMS (FLT3 o CD135, *FMS-like tyrosin-kinase* 3; Casacuberta-Serra et al., 2017) y Notch

(Nagaraj et al., 2009). En condiciones normales o tras una activación clásica por inflamación aguda, las IMCs migran a través del torrente sanguíneo, donde adquieren marcadores específicos y funciones de leucocitos circulantes, hasta los tejidos diana periféricos y los ganglios linfáticos, donde se diferencian a macrófagos, granulocitos y células dendríticas (DCs, *dendritic cells*, en inglés). Sin embargo, en condiciones de inflamación crónica, cáncer, sepsis o embarazo las IMCs se acumulan en la médula ósea y bazo, produciéndose un bloqueo parcial de la mielopoiesis que impide su diferenciación a fenotipos maduros. En estas condiciones, y en respuesta a señales débiles pero de larga duración (principalmente factores de crecimiento, citoquinas y señales de estrés del retículo endoplásmico) las IMCs desarrollan una baja capacidad fagocítica y producen altos niveles de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y citoquinas antiinflamatorias, lo que hace que sean incapaces de realizar sus funciones normales y adquieran un potencial inmunosupresor (Veglia et al., 2018). Esta adquisición de propiedades supresoras hace que pasen a denominarse MDSCs. En este punto, y para evitar confusión en la terminología, es importante introducir una clasificación utilizada en la literatura científica para diferenciar dos tipos de monocitos: por un lado están los monocitos residentes, con fenotipo $CD11b^+Ly-6C^{low}Ly-6G^-CD115^+MHC-II^+F4/80^{high}CD11c^-$; mientras que los monocitos inflamatorios (IMos,

inflammatory monocytes, en inglés) presentan un fenotipo $CD11b^+Ly-6C^{high}Ly-6G^-CD115^+MHC-II-F4/80^{high}CD11c^-$, más consistentes con la nomenclatura de las MDSCs. Algunos estudios describen este complejo fenómeno de acumulación de MDSCs como un proceso que requiere dos tipos de señales, la primera de ellas es responsable de la inhibición de su maduración terminal y la segunda es responsable de la activación patológica de estas células, lo que convierte las IMCs en MDSCs (Condamine et al., 2015; Gabrilovich, 2017). Entre los factores que promueven la expansión y activación de las MDSCs se encuentran GM-CSF/M-CSF, SCF, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, S100A8/9, prostaglandinas, VEGF y CCL2, y varios mi-RNAs, entre otros (Cuenca et al., 2011; De Sanctis F. et al., 2016; Nagaraj et al., 2009). Este viraje sí está descrito en el caso del cáncer, donde las MDSCs se transforman en macrófagos asociados a tumor (TAM, *tumor associated macrophages*, en inglés; Ribechini et al., 2017).

» Clasificación y nomenclatura

La nomenclatura de las MDSCs sigue siendo controvertida, debido a su gran plasticidad y variabilidad morfológica. Su denominación como MDSCs hace 10 años no pretendía definir un linaje mieloide distinto y único, sino más bien recoger su función, origen y heterogeneidad. En ratón, las MDSCs se caracterizan por la co-expresión de los marcadores de linaje mieloide (CD11b, también conocido como CR3A o αM -integrina) y de linaje granulocítico (Gr-1; Kusmartsev et al., 2004; Zhu

et al., 2007), por su baja capacidad fagocítica y por la baja o nula expresión de marcadores específicos de madurez como F4/80, CD11c o MHC-II, resultando en una baja eficacia en presentación de antígeno (Moliné-Velázquez et al., 2011; Moliné-Velázquez et al., 2014). Estudios posteriores han permitido una mejor descripción de esta población celular gracias a la existencia de dos epítomos del antígeno de Gr-1: Ly-6C y Ly-6G, codificados por genes diferentes y que pueden ser detectados por separado (Bronte et al., 2016; Youn et al., 2008; Zhu et al., 2007). Esta nomenclatura se debe a que el epítipo Ly-6G fue descrito inicialmente en granulocitos (Fleming et al., 1993), mientras que el Ly-6C se ha visto de forma mayoritaria en células del linaje monocítico (Sunderkotter et al., 2004). Actualmente, la comunidad científica ha establecido una nomenclatura estandarizada para la descripción de las dos poblaciones mayoritarias de MDSCs, basándose en sus características morfológicas y fenotípicas (Bronte et al., 2016): polimorfonucleares o PMN-MDSCs, definidas como $CD11b^+Ly-6C^{low/int}Ly-6G^{high}$; y monocíticas o M-MDSCs, con el fenotipo $CD11b^+Ly-6C^{high}Ly-6G^{-/low}$ (Movahedi et al., 2008). Aunque en la literatura se utilizan de forma habitual el término “MDSCs granulocíticas o G-MDSCs” para referirse a las PMN-MDSCs, se ha determinado más correcto la última denominación, puesto que esta población celular difiere de los neutrófilos en características tan remarcables como la presencia de menos

gránulos, marcaje reducido de CD16 y CD62L y expresión alta de arginasa 1, peroxinitritos, CD11b y CD66b (Rodríguez et al., 2009; Youn et al., 2012). Junto a éstos, son necesarios otros marcadores para la caracterización de las MDSCs, como el receptor de la cadena α de IL-4 (IL-4R, del inglés *Interleukin 4 receptor α -chain*; CD124) y el marcador de macrófagos F4/80, con una expresión variable (Gallina et al., 2006; Huang et al., 2006). En cuanto a subpoblaciones fenotípicas, las PMN-MDSCs no presentan el receptor del factor de estimulación de colonias de macrófagos (M-CSFR, del inglés *Macrophage-Colony Stimulating Factor Receptor*; o CD115) ni CD49d, y la expresión de Gr-1 es alta; mientras que las M-MDSCs, además del resto de marcadores, se ha visto que sí presentan CD49d y CD115, junto con el receptor 2 de quemoquinas (CCR2) y una expresión intermedia de Gr-1 (Gabrilovich et al., 2012).

En la especie humana, las MDSCs han sido principalmente estudiadas en patologías como el cáncer, trauma, sepsis, inflamación crónica; y ha sido más recientemente cuyo se han descrito también en esclerosis múltiple (Ioannou et al., 2012). Sin embargo, su fenotipo se hace difícil de definir debido a que en la especie humana falta un gen homólogo a *gr-1* de ratón en humano (Peranzoni et al., 2010). Junto con la expresión de CD124 (Mandrizzato et al., 2009) y CD11b también presente en ratón, las MDSCs humanas presentan otro marcador de linaje mieloide, el CD33, y otros marcadores de leucocitos como CD3, CD19 o CD56 (junto con CD14 y CD15, son conocidos como marcadores de

linaje o Lin; Lechner et al., 2010). El fenotipo equivalente en humano a las dos poblaciones de MDSCs anteriormente descritas en ratón es CD11b⁺CD14⁻CD15⁺CD66b⁺ para las PMN-MDSCs y CD11b⁺CD14⁺CD15⁻HLA-DR^{-/low} para las MDSCs (Bronte et al., 2016; Wang et al., 2015). Por otra parte, mientras que las M-MDSCs presentan una alta expresión de CD33, las PMN-MDSCs presentan una leve inmunorreactividad para este marcador. Además, recientemente se ha descrito la expresión del receptor 1 tipo lectina de LDL oxidado (LOX-1) como marcador de PMN-MDSCs (Condamine et al., 2016). Una tercera población, aún por describir en ratón, presenta el fenotipo Lin-HLA-DR-CD33⁺, y representa un grupo mixto de MDSCs que comprende progenitores más inmaduros.

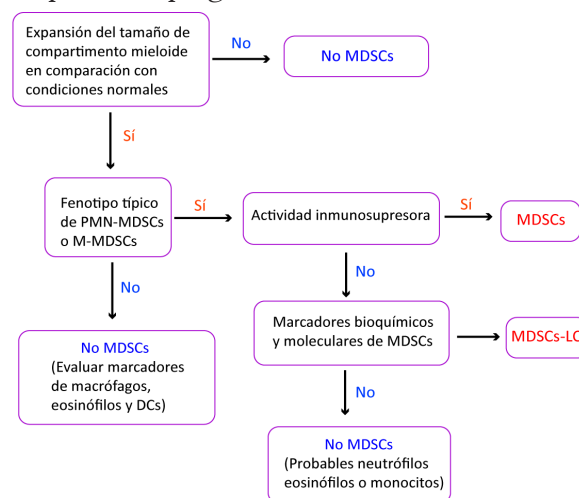


Figura 6. Algoritmo propuesto por Bronte y colaboradores para la clasificación y nomenclatura de las MDSCs en función de su fenotipo, actividad y características bioquímicas. Modificado de (Bronte et al., 2016).

Esta población de MDSCs inmaduras, con alta capacidad inmunosupresora, se ha definido como MDSCs de estadios previos o eMDSCs (en inglés, *early-stage MDSCs*).

Patología /Especie	EAE/EM (pico) ¹		Glioma ²		SCI ³	Envejecimiento ⁴
	G-MDSCs	M-MDSCs				
RATÓN	CD11b^{high} Gr-1⁺ Ly-6C^{int} Ly-6G^{high} MHC-II⁻ F4/80⁻ Arg-I⁺ iNOS⁻ CD11c⁻	CD11b^{high} Gr-1⁺ Ly-6C^{high} Ly-6G^{-/low} MHC-II^{-/low} CD124⁺ F4/80⁺ Arg-I⁺ iNOS⁺ CD115⁺ CD11c^{-/low} CD62L⁺ CCR2⁺	CD11b⁺ Ly-6C^{low} Ly-6G^{high} Gr-1⁺ Arg-I⁺ CD124⁺ IL-10⁺ PD-L1⁺		CD11b⁺ CD45⁺ Gr-1⁺ Ly-6C⁺ Ly-6G⁻ CCR2^{high} iNOS⁺ Arg-I⁺	CD11b⁺ Gr-1⁺ CD115⁺
HUMANO	CD15⁺ CD33⁺ HLA-DR^{low} CD14⁻ PD-L1⁺	CD14⁺ CD33⁺ HLA-DR⁻ CD15⁻	G-MDSCs	M-MDSCs	CD11b⁺ CD115⁺ CD33⁺ HLA-DR⁻	CD11b⁺ CD14^{low} PD-L1^{high} CD33⁺ LIN⁻ HLA-DR⁻ B7-H1^{high}
			CD33⁺ HLA-DR⁻ CD15⁺ CD14⁻	CD33⁺ HLA-DR⁻ CD15⁻ CD14⁺		

Tabla 2. Marcadores de superficie de las MDSCs en diferentes patologías y especies. En negrita aparecen los marcadores más comúnmente aceptados para las MDSCs en cada subpoblación. 1) Cantoni et al., 2017; Ioannou et al., 2012; Moliné-Velázquez et al., 2011; Moliné-Velázquez et al. 2014; Zhu et al., 2007; Zhu et al., 2011; 2) Kohanbash et al., 2013; Zhu et al., 2011 3) Saiwai et al., 2013; 4) Verschoor et al., 2013)

Sin embargo, la caracterización fenotípica anteriormente descrita es condición necesaria pero no suficiente para denominar “MDSCs” a una población celular. Para ello se requiere la comprobación de su función inmunosupresora y de sus características bioquímicas (Figura 6), las cuales se explicarán en el siguiente epígrafe.

En esclerosis múltiple, dos recientes estudios han definido el fenotipo de las MDSCs extraídas de sangre periférica de pacientes con la variante EM-RR, definiendo la población total de MDSCs como CD33b⁺HLA-DR^{neg} (Cantoni et al., 2017) y la subpoblación

PMN-MDSCs como HLA-DR^{-/low}CD14⁻CD15⁺CD33⁺, mientras que la subpoblación M-MDSCs aún está por describir (Ioannou et al., 2012). Un resumen de los marcadores de MDSCs se encuentra en la Tabla 2.

» Mecanismos de inmunosupresión de las MDSCs

La principal característica funcional de las MDSCs es su capacidad supresora de la respuesta inmune a través de la supresión de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de diferentes

maneras, así como la de inducir la formación *de novo* de células T reguladoras (T reg) evidencias que provienen principalmente del estudio del ambiente inmune tumoral (Figura 7). Aunque los mecanismos a través de los cuales las MDSCs ejercen su actividad se basan principalmente en el control del metabolismo del aminoácido L-Arginina (Kusmartsev et al., 2004; Peluffo et al., 2004; Rodríguez and Ochoa, 2008), se han demostrado diferentes modos de acción en los dos fenotipos de MDSCs. Por una parte, las M-MDSCs suprimen la respuesta de los linfocitos T de una forma tanto específica de antígeno como inespecífica y a través del aumento de óxido nítrico (NO, *nitric oxide*, del inglés) producido por la expresión de la enzima iNOS (del inglés inducible *nitric oxide synthase*), junto con la producción de prostaglandina E2 (PGE2). Por otra parte, las PMN-MDSCs, a pesar de ser las más abundantes en circulación, tienen una menor capacidad inmunosupresora mediada por GM-CSF llevada a cabo sólo de forma antígeno-específica relacionada con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS; Dolcetti et al., 2010; Gabrilovich et al., 2012; Ribechini et al., 2017; Youn et al., 2008).

La alteración del metabolismo de L-Arginina y la modificación de su concentración en el medio extracelular provocado por la actividad de las MDSCs desencadena diversas cascadas de señalización intracelular en los linfocitos T que desembocan en su supresión. La L-arginina es un aminoácido esencial en neonatos y jóvenes, aunque no esencial en adultos sanos, que sirve como sustrato

de las enzimas arginasa-I (Arg-I, que cataliza la reacción que genera urea y L-ornitina dentro del ciclo de la urea; Bronte and Zanovello, 2005) y la enzima iNOS (con óxido nítrico y citrulina como productos), enzimas que pueden ser expresadas por las MDSCs. La actividad Arg-I produce un aumento en el catabolismo de la L-arginina en el interior de las MDSCs, lo que conlleva una depleción de L-arginina en el medio extracelular. Este hecho se ha relacionado con varios efectos en los linfocitos T, entre ellos una disminución de la expresión de la cadena ζ de la subunidad CD3 del receptor de la célula T (TCR, del inglés T Cell Receptor), principal componente de la transducción de señales del TCR, lo que desencadena la internalización del receptor y la anergia de la célula T (Rodríguez and Ochoa, 2008; Zea et al., 2005). Además, se previene la activación de reguladores del ciclo celular como son la ciclina D3, la quinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4, del inglés *cyclin-dependent kinase 4*; (Rodríguez et al., 2007) y la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K, del inglés *Phosphoinositide 3-kinase*, Zea et al., 2005). Esto, junto con una disminución de la producción de IL-2 (principal citoquina activadora de la proliferación de linfocitos T; Waters et al., 2017) e IFN- γ , conlleva una disminución en la capacidad proliferativa de los linfocitos T. Además, la formación de urea y L-ornitina en el interior de la MDSC tras la metabolización de la L-arginina inhibe a las proteínas quinasas y alteran la traducción de proteínas en los linfocitos

T. Por otro lado, estos procesos metabólicos generan poliaminas, como la esperimina, que disminuyen en los macrófagos la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Zhang et al., 1997).

Junto a la Arg-I, la enzima iNOS juega un papel importante en la supresión de linfocitos T, contribuyendo a la depleción de L-arginina en el medio extracelular, y asociada a la inhibición de la traducción de proteínas de señalización en el linfocito T. Por una parte, de forma directa a través de la producción de especies reactivas de nitrógeno, que provocan la nitrosilación del receptor de linfocito T (TCR, *T cell receptor*) y de residuos de cisteína en STAT1 con el consiguiente bloqueo de la vía de señalización de IFN- γ (Mundy-Bosse et al., 2011; Redd et al., 2017), y por otra parte, de forma indirecta mediante la activación de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs) y la consiguiente producción de guanosina 3'5' monofosfato cíclica (GMPC), que alteran la expresión del receptor de IL-2 de los linfocitos T y su síntesis, disminuyendo por tanto la proliferación de linfocitos T (Kirken et al., 1998).

Además de todo esto, la expresión conjunta de ambas enzimas por parte de las MDSCs genera la producción de NO y urea (por la actividad de iNOS) y aniones superóxido (O_2^- ; por la actividad de Arg-I; Bronte and Zanovello, 2005). La reacción química entre NO y O genera peroxinitritos, uno de los oxidantes más potentes del organismo. Estos agentes pueden cruzar la membrana plasmática de las MDSCs e introducirse en los linfocitos T, funcionando como mensajeros extra- en

intracelulares y reduciendo la respuesta a los complejos MHC-antígeno (Nagaraj and Gabrilovich, 2007). Los peroxinitritos también reducen la unión de los péptidos antigénicos a las moléculas de MHC en células tumorales y bloquean la migración de células T mediante la nitración de quimiocinas específicas de células T (Molon et al., 2011). Por último, los peroxinitritos promueven la apoptosis de los linfocitos T mediante la nitración de los canales iónicos dependientes de voltaje presentes en la membrana de los linfocitos T, lo que induce la expresión de la citocromo C oxidasa 2 (COX2) y provoca la cascada de caspasas que desemboca en la apoptosis de la célula.

Por otra parte, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, en inglés reactive oxygen species), entre ellas el peróxido de oxígeno (H_2O_2), por parte de las MDSCs está íntimamente ligada a la regulación de la función de los linfocitos T a través de la supresión de la expresión de la cadena ζ de CD3 del TCR (Otsuji et al., 1996). Además, pueden también inducir la apoptosis del linfocito T mediante la nitración de residuos de tirosina tras el contacto celular con la MDSC (Hildeman et al., 2003).

Otro de los mecanismos supresores de las MDSCs recientemente descritos en cáncer es la inducción de células T reguladoras (Treg), bien promoviendo su expansión o incluso su generación *de novo* (Huang et al., 2006; Serafini et al., 2008), a través de la interacción

entre CD40 y el ligando de CD40 (CD40L). La presencia de IFN- γ producido por las células T del tumor y de IL-10, estimula la expresión de CD40 por parte de las MDSCs, el cual interacciona con el CD40L presente en la membrana

producción de TGF- β y ácido retinoico por parte de MDSCs CD14⁺HLA-DR^{-/low} (Hoechst et al., 2011).

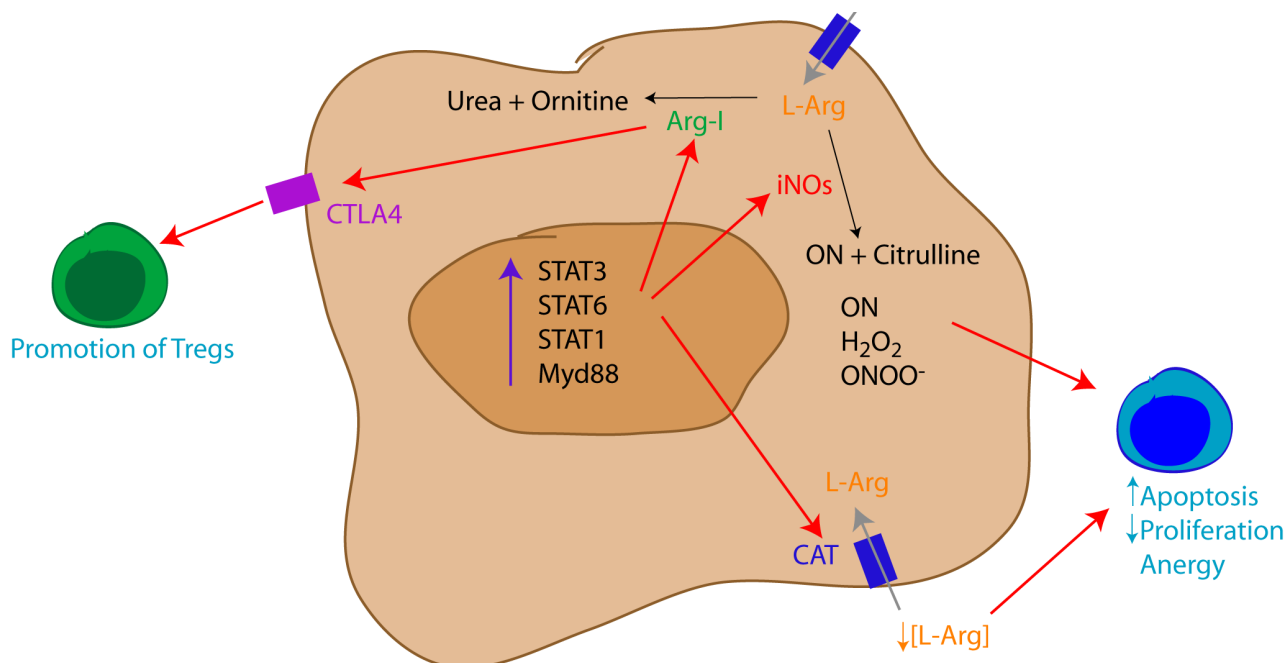


Figura 7. Mecanismos de supresión de las MDSCs. La expresión de los factores de transcripción nucleares tipo STAT da lugar a la expresión de Arg-I y/o iNOS y CAT. Por una parte, la expresión de la Arg-I provoca la disminución de L-Arginina en el medio extracelular, lo que desemboca en una reducción de la proliferación del linfocito T por la disminución de la expresión de IL-2, junto con la anergia a través del bloqueo del TCR. La disminución de la concentración de L-Arginina, junto con la presencia de los productos de la reacción catalizada por Arg-I e iNOS, junto con los peroxinitritos y ROS, inducen la apoptosis del linfocito T. La activación de CTLA-4, además, está relacionado con la promoción de T regs.

de los linfocitos T y provoca su expansión como Tregs (Pan et al., 2010), siendo este mecanismo dependiente únicamente de la expresión de Arg-I y no de iNOS y requiriendo la expresión del antígeno linfocitario citotóxico 4 (CTLA-4, cytotoxic lymphocyte antigen 4, en inglés) por parte de las MDSCs (Huang et al., 2006; Yang et al., 2006).

En la especie humana, se ha demostrado que la transdiferenciación de linfocitos de tipo Th17 a células Treg estaba mediada por la

» MDSCs en EAE

Como ya se ha descrito anteriormente, existen diversas poblaciones celulares implicadas en el paso de episodios de brote de síntomas a períodos de remisión. Entre estas, podemos destacar poblaciones celulares como las células T reg (tanto CD4⁺ como CD8⁺), macrófagos M2, células $\gamma\delta$ NKT (*natural killer T cells*, en inglés), células iNKT (*invariant natural killer T cells*, en inglés), y células dendríticas reguladoras (Koutrolos et al.,

2014; Miron et al., 2013; P arekh et al., 2013). A todas ellas se les unen las MDSCs, cuyo papel en este modelo está siendo cada vez más estudiado.

Existen evidencias crecientes de la presencia de MDSCs en el modelo de EAE. Por una parte, el estudio de expresión génica en la médula espinal de ratones con EAE tanto en el pico de síntomas clínicos como en los períodos de remisión muestra que el gen *arg-1*, entre los 22.000 analizados, tiene una mayor tasa de expresión en comparación con ratones control, asociado a una mayor actividad Arg-1 en el pico de máxima afectación clínica, pero no en fases de recuperación (Carmody et al., 2002; Xu et al., 2003).

Por otra parte, el estudio de las poblaciones esplénicas de ratones con EAE demostró un incremento de las células mieloides (CD11b⁺) en el momento de incremento de síntomas, con gran capacidad supresora de linfocitos T CD4⁺. La caracterización de las subpoblaciones de estas células en base al marcador de granulocitos (Gr-1) y de sus dos epítomos, Ly-6C y Ly-6G, arrojó tres poblaciones: Ly-6C^{low} Ly-6G⁻ (población mixta de monocitos y eosinófilos); Ly-6C^{int} Ly-6G^{high} (población con características neutrofilicas); y Ly-6C^{high} Ly-6G^{-/low} (con características monocíticas). De todas ellas, se demostró que sólo la última presentaba una alta capacidad de supresión de la proliferación y de promoción de la apoptosis de los linfocitos T tanto CD4⁺ como CD8⁺ activados de forma policlonal mediante anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (Zhu et al., 2007). Además, otros autores demostraron que esta supresión

requiere de contacto celular directo (Apolloni et al., 2000; Slaney et al., 2011; Zhu et al., 2007). Durante el episodio inflamatorio, la infiltración de células T en el parénquima del SNC está acompañada por el reclutamiento de células mieloides (Benveniste, 1997; Stuve et al., 2002); entre ellas, monocitos inflamatorios con un marcaje de superficie CD11b⁺ Ly-6C^{high} CCR2^{high} CX3CR1^{low} (Saederup et al., 2010; Si et al., 2010) y compatibles con el fenotipo de MDSCs. Tras la inmunización, estas células proliferan y migran al bazo y el tejido diana en una forma dependiente de MCP-1 (CCL2)/MCP-3 (Ioannou et al., 2012; Jia et al., 2008). Aunque ausentes en condiciones normales, en la médula espinal se ha visto que los IMos pueden llegar a ser el 30 % de la poblaciones infiltradas durante un episodio inflamatorio (Zhu et al., 2007). Una vez allí, estas células se diferencian a fenotipos maduros como macrófagos y células dendríticas, inducen la polarización de la microglía residente hacia fenotipos M1 y actúan como APCs para los linfocitos T, convirtiéndolos en linfocitos T encefalitogénicos reactivos contra la mielina (Shechter et al., 2009; Yamasaki et al., 2014; Zhu et al., 2011); lo que al final desemboca en áreas con destrucción de mielina. Sin embargo, una parte de estas células permanecen con fenotipo inmaduro CD11b⁺ Ly-6C^{high} Ly-6G^{-/low}, con expresión de F4/80, CD124, algunas moléculas de adhesión como CD11a y CD49, bajos niveles de CD62L y falta de expresión del marcador de maduración CD31 (Haile et al., 2010; Figura 8A). En el punto máximo de afectación, células con el mismo fenotipo CD11b⁺ Ly-6C^{high} Ly-6G^{-/low} se

comportan de manera muy diferente. Debido al desconocimiento del origen de las MDSCs y la ventana temporal en la que permanecen con las características propias de su denominación como MDSCs, no se puede saber si su presencia en el punto de máxima afectación se debe a una segunda infiltración o a un viraje funcional de las mismas células infiltradas durante el comienzo de síntomas, como se ha descrito para macrófagos derivados de monocitos y microglía (Kigerl et al., 2009; Melero-Jerez et al., 2016; Miron et al., 2013). Así, en este contexto, las MDSCs expresan Arg-I e iNOS y ejercen su función inmunosupresora sobre las células T $CD4^+$ y $CD8^+$, en un proceso mediado por PDL-1, e inducido por la expresión de $IFN-\gamma$, GM-CSF, $TNF-\alpha$ y CD154 por los linfocitos T durante el proceso de presentación antigénica (Zhu et al., 2011). Además, se piensa que puedan estar involucradas en la promoción de linfocitos T reguladores, aunque los mecanismos son aún desconocidos (Figura 8B). A este respecto, las M-MDSCs comparten algunas características fenotípicas con otra de las poblaciones que participan en la supresión durante el punto de máxima afectación, i.e., los macrófagos M2. Sin embargo, al contrario que ellos, las M-MDSCs presentan bajos niveles del marcador de presentación antigénica MHC-II y no tiene actividad fagocítica (Moore et al., 2015). Es más, las MDSCs pueden expresar conjuntamente Arg-I e iNOS, mientras que los macrófagos M2 expresan mayoritariamente Arg-I (Melero-Jerez et al., 2016; Moliné-Velázquez et al., 2011; Moliné-Velázquez

et al., 2014). Diversos estudios confirman la alta capacidad plástica de estas células, que hace que puedan adoptar diferentes roles inflamatorios (Zhu et al., 2011). De esta forma, células $Ly-6C^{high}Ly-6G^{-/low}$, -o, por ser consistentes con la literatura científica al respecto, “células similares a MDSCs” (*MDSCs-like*) extraídas de la sangre de ratones EAE antes del desarrollo de síntomas clínicos (a 5 dpi) no inducían la inmunosupresión de linfocitos T *ex vivo* (Slaney et al., 2011); sin embargo, cuyo se activaban *in vitro* utilizando un cóctel de citoquinas que contenía $IFN-\gamma$, GM-CSF y lipopolisacárido (LPS), y se transferían a ratones con EAE, se inducía un desarrollo más leve de la enfermedad (King et al., 2009). En este mismo estudio, utilizo la variante EAE-RR, se relacionó la presencia de células $Ly-6C^{high}$ en sangre antes del debut de síntomas a un inicio de la enfermedad más temprano y a una mayor severidad de la enfermedad (King et al., 2009). En el estudio llevado a cabo por Mildner y colaboradores, se estudió la evolución de la EAE cuyo se deplecionaban las células $CD11b^+Ly-6C^{high}$ utilizando un anticuerpo bloqueante de CCR2 (y por lo tanto, con menor capacidad de infiltración en el SNC), en dos momentos del curso clínico: durante la fase inductora no se vio que se afectase el curso clínico; mientras que si se deplecionaban durante la fase efectora, el curso clínico era más moderado. De esta forma, demostraron que una moderación de la patología de la EAE estaba asociada con una reducción en la acumulación de $CD11b^+Ly-6C^{high}Ly-6G^{-/}$

low en el pico (Mildner et al., 2009). En otro estudio llevado a cabo por Paré y colaboradores demostraron una menor infiltración de células CD11b⁺ Ly-6C^{high} deficientes en la expresión del gen Il-1b antes del debut de la EAE; así como su promoción como APCs mediada por la producción de GM-CSF por parte de las células endoteliales de la BHE (Pare et al., 2018). Ninguno de estos estudios termina por definir cuál es la contribución

de las MDSCs al desarrollo de la enfermedad. Por una parte, los estudios de Mildner y King asocian la acumulación de MDSCs con una exacerbación de la enfermedad *in vivo* pero no estudian su capacidad inmunosupresora *in vitro*, por otro lado, Zhu demuestra la inmunosupresión ejercida por estas células en co-cultivos *in vitro* pero no la contribución de las MDSCs a la patología *in vivo*.

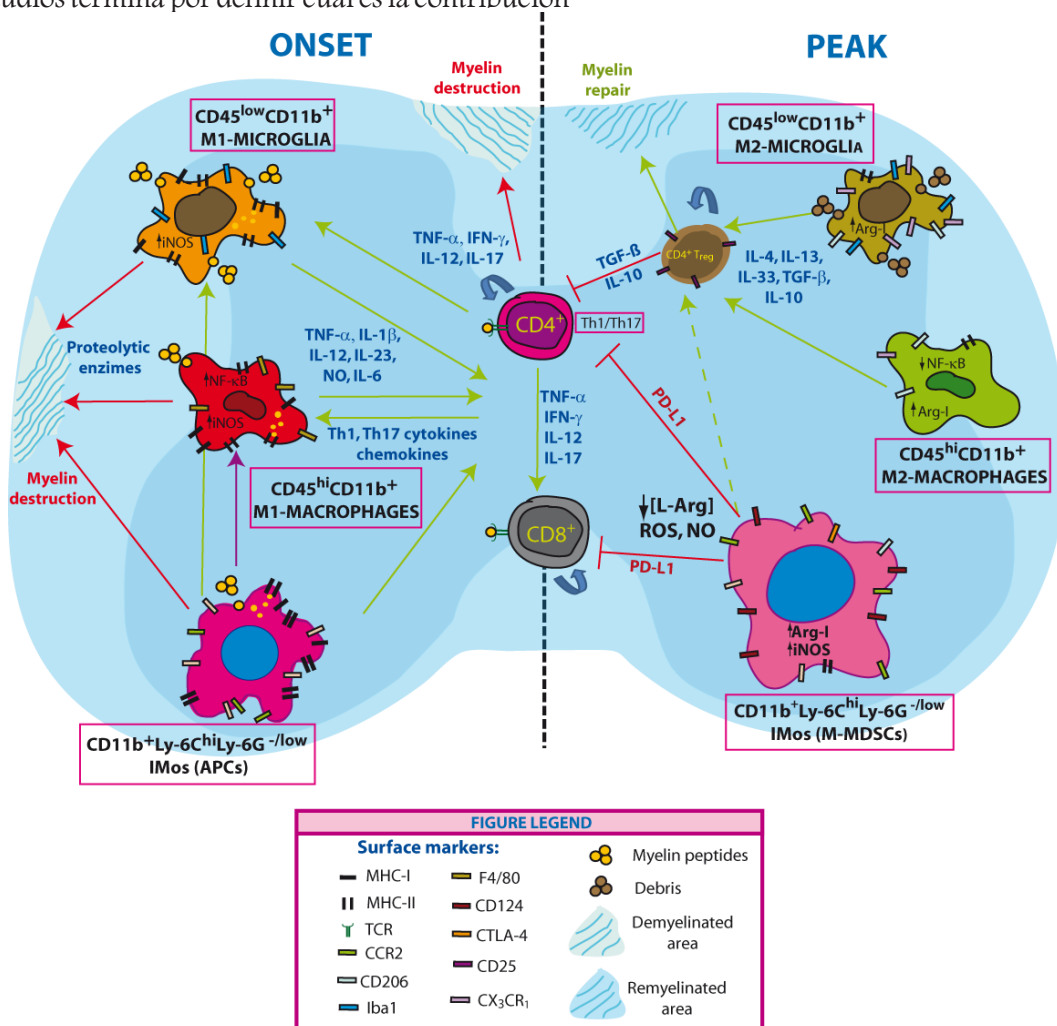


Figura 8. Funciones pleiotrópicas de los agentes celulares implicados en el curso clínico de la EAE. ONSET (A): Los linfocitos T infiltran el SNC y reconocen péptidos de mielina presentados por la microglía residente y por macrófagos. Esto da lugar a la proliferación de los linfocitos T, que producen citoquinas proinflamatorias y quimiocinas, resultado en la activación de microglía/macrófagos hacia un fenotipo M1. Las células inmaduras Ly-6C^{high}Ly-6G^{-/low} entran a la vez en el SNC y se diferencian a macrófagos. Estos macrófagos M1 aumentan su capacidad fagocítica y secretan moléculas proinflamatorias que activan la proliferación de los linfocitos T, y enzimas proteolíticas que destruyen la mielina circundante. Las células también contribuyen a la polarización de la microglía hacia fenotipos M1. Una parte de las células Ly-6C^{high}Ly-6G^{-/low} infiltradas permanecen en un estado inmaduro, funcionan como APCs. PEAK (B): La microglía y macrófagos presentan una activación alternativa tipo M2. Las células Ly-6C^{high}Ly-6G^{-/low} presentes se diferencian a macrófagos M2. La microglía y macrófagos secretan

citoquinas antiinflamatorias que promueven la activación y expansión de linfocitos Treg, los cuales suprimen a los linfocitos TCD4⁺ efectores. Las células Ly-6C^{high}Ly-6G^{-/low} ejercen una inmunosupresión sobre los linfocitos TCD4⁺ y promueven la activación de los linfocitos T reg, pasando a denominarse MDSCs (Melero-Jerez et al., 2016).

Estos estudios demuestran por lo tanto la enorme plasticidad de las MDSCs dependiendo tanto del ambiente inflamatorio en el que se encuentren como del momento temporal de la enfermedad, en respuesta a señales que activen subpoblaciones, funciones y rutas de señalización específicas.

La participación de las MDSCs en EM ha sido poco estudiada hasta el momento. Por una parte, se ha demostrado el aumento significativo de la presencia de MDSCs HLA-DR^{-/low}CD14⁻CD33⁺CD15⁺ en la sangre circulante de pacientes con EM-RR en comparación con pacientes en remisión y sujetos sanos; junto con una disminución paulatina de su proporción cuyo se realizó un estudio longitudinal en pacientes que alcanzaban remisión (Ioannou et al., 2012). Además, estas células extraídas de pacientes con EM-RR activa mostraron una alta capacidad inmunosupresora sobre linfocitos T autólogos y activados, observable tanto en una disminución de su nivel de activación como de su proliferación, en un mecanismo mediado nuevamente por PD-L1 (Ioannou et al., 2012). En otro estudio se observó una menor frecuencia de M-MDSCs circulantes en pacientes con EM-RR comparado con sujetos sanos, disminución asociada a una mayor expresión del microRNA miR-223 en las MDSCs de los pacientes, y parcialmente contrarrestada por el tratamiento con acetato de glatirámico, uno de los fármacos

disponibles para EM (Cantoni et al., 2017).

» MDSCs y neuroprotección

Teniendo en cuenta los datos crecientes que apuntan a un papel inmunosupresor de las MDSCs en patologías del SNC, podría ser que tuviesen un papel en la protección de los componentes celulares del sistema (mielina/oligodendocitos y neuronas/axones), ya sea de forma directa o indirecta mediante la generación de un ambiente favorable. Como se ha descrito con anterioridad, el pleiotropismo de las MDSCs hace que puedan actuar como células con fenotipo M1 o M2 dependiendo del momento temporal de la EAE. Además, la expresión de marcadores de tipo M2 y la presentación de capacidad inmunosupresora lleva a pensar que pueda participar en la resolución de la inflamación de los episodios de EAE. A este respecto, la exposición de OPCs a medio condicionado de microglía tipo M2 aumenta su proliferación, migración y diferenciación, mientras que la depleción in vivo de las células M2 impedía su diferenciación y su capacidad remielinizante (Miron et al., 2013). Por otra parte, la polarización de macrófagos M1 hacia un fenotipo M2 promueve una respuesta regenerativa de crecimiento de axones sensoriales adultos y limita el daño inflamatorio

secundario en un modelo de lesión medular (Saiwai et al., 2013). Sin embargo, a día de hoy no existen estudios que demuestren el papel protector de las MDSCs en EM y EAE, si lo hubiera.

3. Oligodendroglía en esclerosis múltiple y EAE

» Desarrollo de la oligodendroglía

Las enfermedades desmielinizantes primarias, entre ellas la más prevalente es la esclerosis múltiple, son aquellas en las que la destrucción de mielina es la principal causa de afectación neurológica. La muerte de oligodendrocitos y la pérdida de mielina son eventos comunes de forma secundaria a varias patologías como lesión medular por traumatismos (Li et al., 2017), enfermedad de Alzheimer (Bartzokis et al., 2007), enfermedad de Huntington (Huang et al., 2015) y SNC irradiado (Wong et al., 2015); mientras que en la esclerosis múltiple esta desmielinización aparece de forma primaria. La regeneración del SNC en enfermedades desmielinizantes como la EM está en gran parte mediada por un proceso endógeno de remielinización, esto es, la recuperación parcial de mielina alrededor de axones que la habían perdido, restableciendo con ello la conducción saltatoria y el soporte trófico/metabólico al axón. Esta remielinización

espontánea se cristaliza en las lesiones en sombra observadas en la histopatología de pacientes de EM (Frohman et al., 2006a; Prineas et al., 1993) y la protagonizan los OPCs existentes en el SNC adulto, que podrían ser reclutadas al área lesionada. Una vez allí, proliferarían y se diferenciarían a oligodendrocitos maduros con capacidad remielinizante (Frohman et al., 2006a; Miller et al., 2002), en un proceso con gries similitudes morfológicas con lo que ocurre durante el desarrollo (Clemente et al., 2011).

Los oligodendrocitos se describieron por primera vez por el neurocientífico español Pio del Río-Hortega en 1921 (Del Río-Hortega, 2012). Pertenecientes a la macroglía, representan el equivalente a las células de Schwann en el SNC, y se generan durante el desarrollo embrionario a partir de los OPCs. Estas células proceden de las células progenitoras neuroepiteliales (NPC, *neuroepithelial progenitor cells*, por sus siglas en inglés) que en el estadio embrionario E9 se transforman en glia radial, la cual posteriormente sufre un viraje funcional que da lugar a astrocitos y a OPCs. La migración se produce siguiendo distintos patrones según la zona del SNC. En el teléncefalo de roedores existen tres oleadas, con diferente origen (ventral/dorsal), mientras que en la médula espinal se producen dos oleadas, siempre con origen ventral (Barateiro et al., 2014).

Los OPCs, con morfología monopolar en estadio más tempranos de su maduración (Figura 9 A), proliferan en respuesta a

morfógenos como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-AA, *platelet derived growth factor* en inglés), el factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 (FGF2, *fibroblast growth factor 2*) y Sonic hedgehog (Shh). Además, Shh es la principal señal ventralizante (Richardson et al., 2006; Rowitch and Kriegstein, 2010). Aunque existen un reemplazo de la mayoría de los OPCs generados durante las primeras oleadas, algunos estudios han demostrado la existencia de un reservorio de estos OPCs que son capaces de sobrevivir y diferenciarse para mielinizar

el telencéfalo en caso de que las oleadas posteriores se vean impedidas (como por ejemplo, en el caso de prematuridad; Kessaris et al., 2006). Para migrar, los OPCs adquieren una morfología bipolar y responden a señales quimioatrayentes y quimiorepelentes, como factores de crecimiento (PDGF, VEGF y HGF; Bribián et al., 2006; Hayakawa et al., 2011; Murcia-Belmonte et al., 2016); componentes de la matriz extracelular como laminina, fibronectina, vitronectina, tenascina-C y anosmina-1 (Bribián et al., 2008; Miller

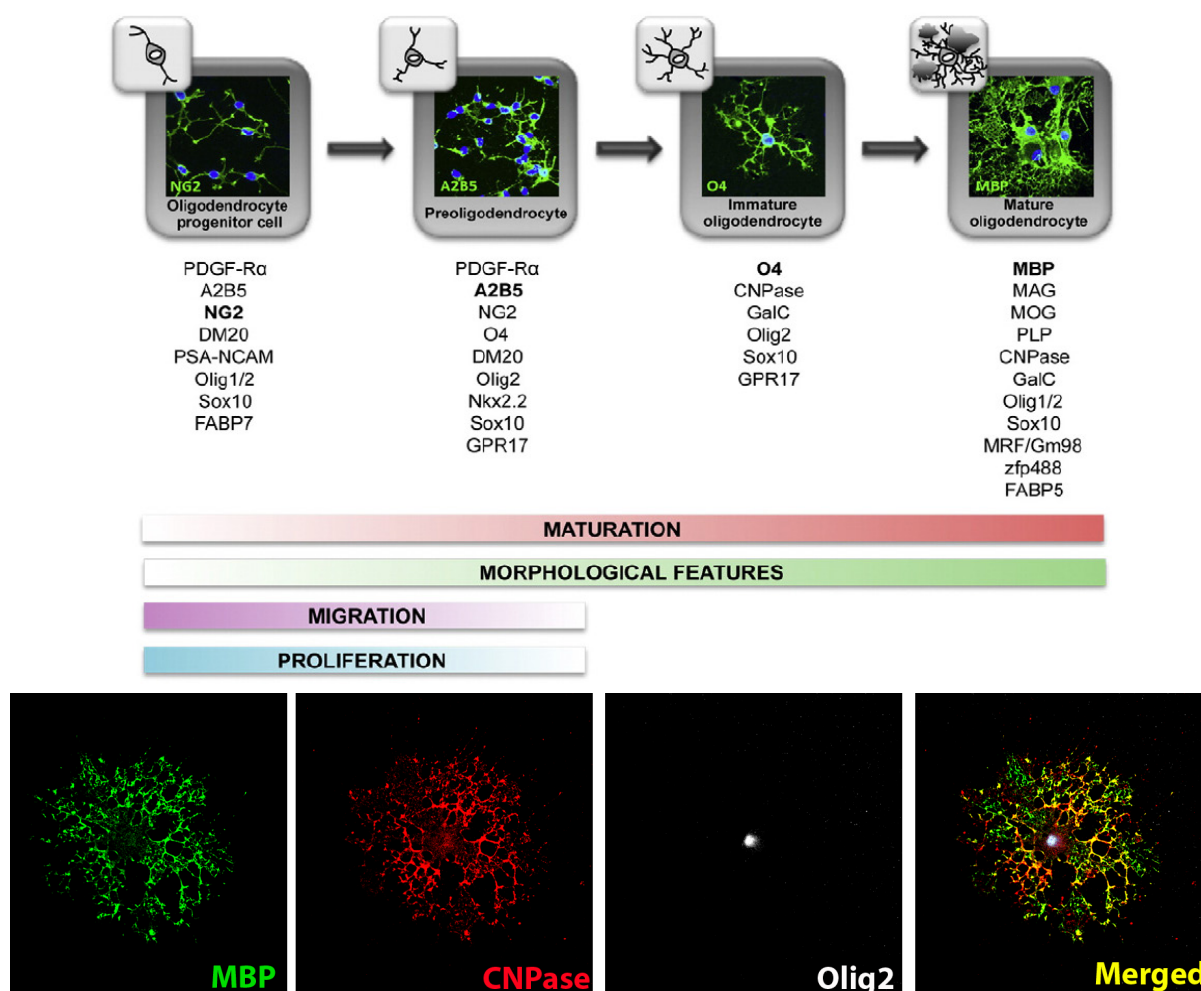


Figura 9. Marcadores específicos de las células de linaje oligodendroglial. A: Marcadores a lo largo de las distintas fases del desarrollo, de Barateiro et al., 2014. B: Imagen propia de oligodendrocitos maduros de ratones P0.

et al., 2002; Murcia-Belmonte et al., 2016) y moléculas asociadas con la guía axonal como semaforinas, netrina-1 y la quimiocina CXCL1 (Okada et al., 2007; Spassky et al., 2002; Tsai et al., 2002; Zhang et al., 2004). Además, se ha visto la importancia de las señales producidas por la células endoteliales para la migración de los OPCs, los cuales se unen al endotelio a través de la interacción de CXCR4 de los OPCs con CXCL12 de las células endoteliales (Tsai et al., 2016).

Una vez que alcanzan el destino, la población de OPCs se expye hasta alcanzar un equilibrio homeostático. Para proliferar, se combinan señales de activación de proliferación e inhibición de la diferenciación. Entre estas señales cabe destacar factores estimuladores como PDGF y la inhibición de las rutas de señalización de Wnt y Notch (Fancy et al., 2011), así como la inhibición de los factores de transcripción Olig1/Olig2 y Sox10 mediante los factores de inhibición de la diferenciación ID2, ID4 y Hess5 (Kremer et al., 2011). En ratón adulto, los OPCs representan entre un 8-9% de la población total de la sustancia blanca y un 2-3% de la sustancia gris (de Castro F. et al., 2013; Dimou et al., 2008). Estas células representan un potencial para reparar lesiones por lo que son un creciente objeto de estudio en enfermedades desmielinizantes como la EM.

La inhibición de los factores que impiden la diferenciación descritos arriba permite la activación de una red de factores de transcripción que incluye Nkx2.2, Olig1/2, Sox10 y Myrf (factor regulador de mielina, *myelin regulator factor* en

inglés; Emery, 2010; Li et al., 2009). La maduración de los OPCs conlleva su diferenciación hacia oligodendrocitos y va acompañada de la adquisición de una morfología más ramificada (Figura 9 A-B) y de la capacidad de envolver los axones de las neuronas con su membrana, alcanzando un tamaño final proporcional al axón mielinizado (de Castro F. and Bribián, 2005; Miller et al., 2002).

En la especie humana hay pocos datos acerca del desarrollo de los OPCs. Se sabe que aparecen en el cerebro anterior a las 10 semanas de gestación y alrededor de la semana 15 se aprecian en las eminencias ganglionares y en la zona subventricular (Barateiro and Fernandes, 2014; Jakovcevski et al., 2009). El estudio llevado a cabo por Leong y colaboradores describió diferentes poblaciones de OPCs, según el nivel de expresión de los marcadores A2B5 y O4 en tejido nervioso embrionario y adulto utilizó la técnica de FACS, siendo más abundantes los OPCs A2B5⁺ en prenatal y los O4⁺ en adulto (Leong et al., 2014). En cuanto a números, un estudio llevado a cabo por Yeung y colaboradores describió la dinámica de OPCs y oligodendrocitos en el cerebro humano a lo largo del desarrollo, observando una reposición anual de 1/300 oligodendrocitos, no relacionado con el aumento en el volumen de mielina dependiente de experiencia (Mount and Monje, 2017).

» La oligodendroglía en condiciones patológicas: esclerosis múltiple

Diferentes escenarios patológicos pueden

provocar la muerte de los oligodendrocitos, ya sean enfermedades desmielinizantes primarias (como la esclerosis múltiple o adenoleucodistrofias), accidentes traumáticos o vasculares (lesión medular, traumatismo craneoencefálico o infarto cerebral), enfermedades neurodegenerativas o esquizofrenia (Goldman et al., 2012). En las lesiones activas de esclerosis múltiple, esta muerte se observa en las placas de patrón III, con la presencia de oligodendrocitos apoptóticos acompañada de activación microglial y astrogial. En estudios recientes con modelos animales se han descrito a los OPCs, y no los oligodendrocitos maduros, como los responsables de la remielinización (Cui et al., 2013). Los OPCs existentes en el adulto pueden reaccionar en estas condiciones y activar una compleja red de eventos que dan lugar a una remielinización parcial y una recuperación de la pérdida de oligodendrocitos. Sin embargo, la presencia de OPCs en los bordes de las placas activas de pacientes de EM, su relativa ausencia en el centro de las placas crónico-activas y su completa ausencia en las placas crónico-inactivas lleva a pensar o bien en una capacidad disminuida de migrar a las zonas desmielinizadas, de diferenciarse o, una vez diferenciados, de remielinizar efectivamente los axones desnudos (Clemente et al., 2013). Además, su número y capacidad de diferenciación disminuye con la duración de la enfermedad (Kulhman et al., 2008). En este escenario, los OPCs responden a las señales producidas por las otras dos poblaciones de la glía presentes en el parénquima

del SNC en diferentes estados de activación, la microglía y la astrogía, así como a las células del sistema inmune infiltradas (este aspecto será descrito con detalle en el siguiente epígrafe).

Por otra parte, la modificación de la composición de la matriz extracelular (ECM, *extracellular matrix*, en inglés) participa en el proceso de remielinización (van Horssen J. et al., 2006). A este respecto, la secreción por parte de los astrocitos de moléculas modificadoras de la ECM durante el desarrollo de una lesión puede convertir un ambiente permisivo para la remielinización en un área inhibidora, dependiendo por una parte de la composición de la ECM y por otra de los receptores de los OPCs (de Castro F. et al., 2013).

» Interacción entre los OPCs y las células del sistema inmune

La presencia de células inmunes en el sistema nervioso central durante un episodio de inflamación siempre ha estado asociada a daño tisular. Sin embargo, desde que en 1998 se trasplantaran macrófagos de la sangre activados de manera “alternativa” y se demostrara una mejora en la recuperación en un modelo de lesión medular, se ha cambiado la visión de las células derivadas de monocitos desde una perspectiva únicamente destructora del tejido hacia un potencial beneficio para la reparación del SNC (Rapalino et al., 1998). Sucesivos estudios han demostrado la necesidad de la presencia de macrófagos de la sangre para la resolución de la inflamación mediante la

secreción de moléculas anti-inflamatorias, como IL-10 (Shechter et al., 2013). La interacción de los macrófagos con proteínas de la matriz extracelular, como el proteoglicano condroitín sulfato, que actúa por otra parte como señal inhibidora del crecimiento de axones (Fawcett, 2009; Silver and Miller, 2004) y de la migración y diferenciación de oligodendrocitos (Sun et al., 2017), permite la adquisición de un fenotipo anti-inflamatorio, lo que a su vez revierte en la producción de factores que disocian la matriz extracelular y permiten el crecimiento axonal (Shechter et al., 2011). Todos estos hechos apuntan a un papel relevante de las células de linaje mieloide en la generación de la cicatriz que permite en última instancia la reparación del tejido (Shechter and Schwartz, 2013). Como hemos indicado anteriormente, se ha descrito la presencia de macrófagos /microglía a en las lesiones activas de EM. En un primer momento, la hipótesis era que, mientras que una lesión en la que el fenotipo de activación pasa de M1 a M2 tendría más probabilidades de convertirse en una placa en sombra parcial o totalmente remielinizada, las lesiones en las que el fenotipo predominante fuese M1 se convertirían en lesiones crónico-activas no resueltas y finalmente en lesiones crónico-inactivas desmielinizadas (Clemente et al., 2013). Sin embargo, aunque Vogel y colaboradores observaron una presencia del fenotipo M1 (definido por los marcadores CD40, CD86, CD80 y CD32) por parte de la microglía en la sustancia blanca aparentemente

normal y por macrófagos y microglía en lesiones desmielinizantes activas, la mayoría de los macrófagos presentaban un fenotipo intermedio M1/M2 (expresión marcadores como el receptor de manosa y CD163; Vogel et al., 2013).

De esta forma, y a pesar de la falta de datos proveniente del estudio de la histopatología, estos fenómenos indican la asociación que existe entre la respuesta inmune innata y los procesos biológicos que llevan a la remielinización y sus protagonistas, los OPCs. En estudios in vitro e in vivo, se ha visto que la microglía activada promueve la neurogénesis y la oligodendroglíogenesis mediada por citoquinas proinflamatorias (como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ) tanto en condiciones patológicas como durante el desarrollo (Butovsky et al., 2006a; Butovsky et al., 2006b; Shigemoto-Mogami et al., 2014). Por otra parte, en el trabajo llevado a cabo por Miron y colaboradores se vio que el viraje funcional de la microglía hacia fenotipos M2 favorecía la proliferación, migración y diferenciación de oligodendrocitos mediada por activina-A (Miron et al., 2013). IGF-1 (*insulin growth factor*, en inglés) es un factor conocido secretado por la microglía tipo M2 que se ha visto que potencia la supervivencia, la diferenciación y la remielinización (Mason et al., 2000). Por otra parte, la fagocitosis del debris de mielina por parte de la microglía/macrófagos es un importante mecanismo a tener en cuenta para permitir la remielinización (Kotter et al., 2006).

Hasta hace pocos años, la relación de la respuesta inmune con el proceso de

remielinización ha sido poco estudiada. Entre las células de la respuesta inmune adaptativa, los linfocitos T efectores polarizados hacia fenotipos Th1 y Th17 (del inglés, *T helper*) se consideran pro-inflamatorios y se han relacionado con la promoción de desmielinización en el SNC. Sin embargo, el hecho de que en las lesiones de EM la infiltración de linfocitos T sea concurrente

al proceso de remielinización hace suponer la implicación de los linfocitos T en este proceso. Así, linfocitos T polarizados hacia Th2 (considerados antiinflamatorios) se han relacionado con neuroprotección y promoción de la remielinización (Bennett and Stuve, 2009; El Behi M. et al., 2017; Hvilsted Nielsen H. et al., 2011). De la misma manera, recientemente

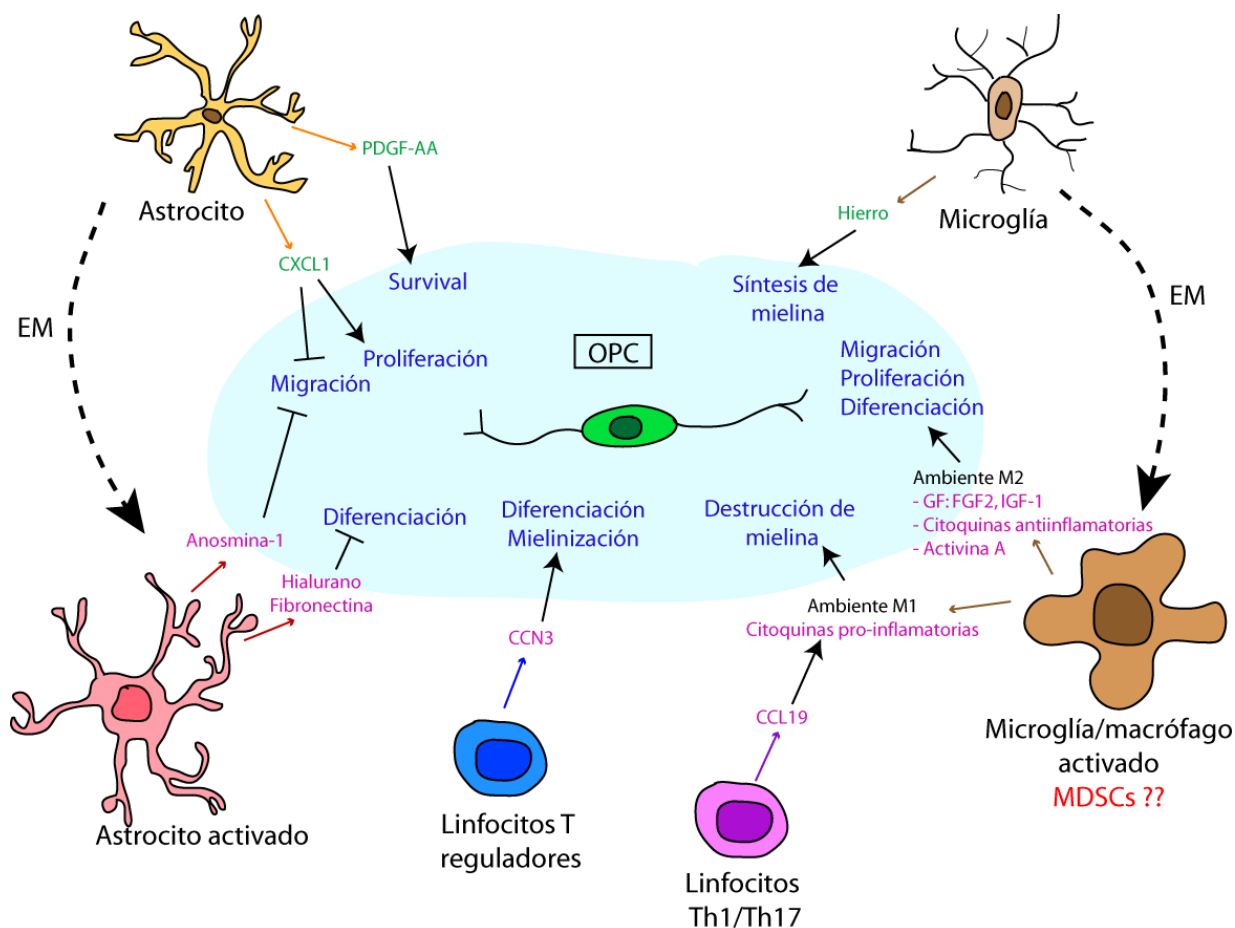


Figura 10. Representación esquemática de la interacción glía-OPCs y células inmunes-OPCs durante el desarrollo y patología. Durante el desarrollo, los astrocitos y microglía secretan diversos factores (en verde) que estimulan (flechas) o frenan (barras) la oligodendroglíogénesis. En condiciones patológicas como la EM, se produce la activación patológica de astrocitos y microglía, junto con la infiltración de células del sistema inmune innato y adaptativo, con la consiguiente secreción de factores solubles (en morado). Los astrocitos activados son capaces de producir moléculas de la matriz extracelular que afectan a la migración y diferenciación de los OPCs. La microglía residente y los macrófagos infiltrados con fenotipo M1 producen factores que favorecen la destrucción de mielina, mientras que un fenotipo M2 favorece el reclutamiento y la activación de los OPCs hacia oligodendrocitos productores de mielina. A este respecto, el efecto que las MDSCs puedan tener bien directamente sobre los OPCs o sobre la polarización de la microglía/macrófagos a M2 es aún desconocido. Por otra parte, los factores secretados por los linfocitos T reguladores favorecen la diferenciación y mielinización, mientras que los producidos por los linfocitos Th1 y Th17 contribuyen a la destrucción de la mielina. Adaptado de Clemente et al., 2013).

se ha descrito el papel de las células Treg en la promoción de la diferenciación de oligodendrocitos y remielinización (Dombrowski et al., 2017).

Sin embargo, a día de hoy se desconocen los efectos directos o indirectos que las MDSCs puedan ejercer sobre los OPCs y oligodendrocitos.

» Estrategias de neuroprotección y remielinización

Como ya se ha comentado, la vaina de mielina en el SNC tiene dos funciones primordiales: el aislamiento de las fibras nerviosas para una correcta transmisión eléctrica y el aporte trófico al axón. En enfermedades desmielinizantes a las que se le suma el componente autoinmune, como es la EM, resulta de vital importancia reestablecer la mielina perdida y con ello disminuir la afectación neurológica, lo que requiere dos pasos fundamentales: i) la modulación de la respuesta inmune, limitando la respuesta pro-inflamatoria y favoreciendo la respuesta anti-inflamatoria; y ii) la promoción de los procesos que desembocan en una correcta remielinización, protegiendo a los OPCs y oligodendrocitos y favoreciendo la producción espontánea de mielina funcional.

Mientras que la totalidad de fármacos disponibles participan en la primera de las estrategias, apenas se ha verificado alguna estrategia de remielinización. Uno de los principales factores a tener en cuenta es la progresiva disminución en la eficiencia de remielinización espontánea es la edad, de manera

más acusada en la sustancia blanca, lo que deja a los axones descubiertos por períodos de tiempo más largos, y que finalmente desemboca en daño del propio axón y mayor acumulación de discapacidad (Franklin y French-Constant 2017). Varios factores podrían explicar este hecho. Por una parte, una menor capacidad de los OPCs de movilizarse y, sobre todo, diferenciarse en las lesiones, como se deduce de la observación de células de linaje oligodendroglial que no han podido diferenciarse en lesiones crónico-inactivas (Chang et al., 2000; Wolswijk, 1998), asociado además a un cambio en la consistencia y densidad de la matriz extracelular (van Horssen J. et al., 2006). Por otra parte, se ha observado una peor eficiencia en el viraje funcional de M1 a M2 de las células del sistema inmune innato (Miron et al., 2013). De esta forma, la edad es un factor clave para el paso de la variante EM-RR a una EM progresiva y crónica, con peor eficiencia de remielinización. Algunos estudios apuntan a que individuos con EM alcanzan el mismo grado de afectación neurológica aproximadamente a la misma edad, independientemente de la variante inicial de la enfermedad y la edad y severidad del debut, apuntando a un subyacente deterioro de la capacidad de remielinización progresivo en el tiempo (Confavreux and Vukusic, 2006a). Sin embargo, dos estudios recientes apuntan a diferentes grados de remielinización en función del perfil de secreción de los linfocitos, y de múltiples factores tanto demográficos como clínicos y paraclínicos (El Behi M. et al., 2017; Kalincik et al., 2017).

Estos dos estudios aportan los primeros pasos para la clasificación de pacientes en función de su eficiencia individual de remielinización, de forma que las estrategias se puedan personalizar.

Un hipotético abordaje de la remielinización ha de tener en cuenta en primer lugar que en el 30 % de las lesiones existe una falta de OPCs suficiente para una efectiva remielinización, mientras que en el otro 70 % los OPCs están presentes pero los defectos provienen de la diferenciación impedida de los OPCs y su dificultad para generar vainas de mielina (Lucchinetti et al., 1999). Por ello, un tratamiento efectivo debería atender no sólo a la diferenciación y formación de la vaina de mielina, sino también a la activación y migración de los OPCs. Entre las dianas para la remielinización se encuentra el bloqueo de las vías que inhiben la diferenciación de los oligodendrocitos, como las vías de Notch y de Wnt. Respecto a la primera, se ha demostrado que el bloqueo de la vía de Notch1 promueve una aceleración de la diferenciación de oligodendrocitos (Zhang et al., 2009), aunque no se observaba una mayor remielinización. En cuanto a las estrategias para la promoción de diferenciación de oligodendrocitos, se ha visto que ésta se ve estimulada por la presencia de actividad eléctrica por parte de los axones desmielinizados a través de la formación de sinapsis glutamatérgicas por los receptores AMPA y kainato (Butt et al., 2014; Gautier et al., 2015; Jensen and Yong, 2016). Por otra parte, la activación de los receptores nucleares RXRy

(Huang et al., 2011) y sus binding partners como el receptor de hormona tiroidea, el PPARy (Minghetti et al., 2014; Yuan et al., 2017), el LXR (Meffre et al., 2015) y el VDR (de la Fuente et al., 2015), se han asociado con una mayor diferenciación de oligodendrocitos. Por otra parte, la modificación de la matriz extracelular y las señales inhibitorias de la diferenciación de oligodendrocitos supone otra posible diana (Behrangi et al., 2017; Kuboyama et al., 2017). En cuanto a estudios que hayan estado o se encuentren en ensayos clínicos, es de destacar el papel de la proteína LINGO-1 (*leucine-rich repeat and immunoglobulin-like domain-containing nogo receptor-interacting protein 1*, en inglés) y del antihistamínico fumarato de clemastina. En cuanto al primero, estudios en ratones *knockout* para *lingo1* muestran una mayor mielinización en desarrollo, y el uso de anticuerpos anti-LINGO1 promueve la remielinización tras la inducción de desmielinización por la toxina lisolecitina (Mi et al., 2005; Mi et al., 2009). Sin embargo, el último ensayo clínico llevado a cabo utilizando opicinumab, un anticuerpo monoclonal anti-LINGO1 (NCT01721161, RENEW study) para neuritis óptica aguda no confirmó una mayor remielinización, comprobada mediante el uso de potenciales visuales evocados. Por otra parte, a finales de 2017 se publicaron los resultados del primer ensayo clínico (NCT02040298) que demuestran el potencial del fumarato de clemastina, un antihistamínico de primera

generación, como terapia remielinizante para EM, tras haber sido comprobada su eficacia en varios modelos animales y en cultivos in vitro de células humanas (Green et al., 2017; Mei et al., 2016). Los efectos atribuidos al fumarato de clemastina residen en la estimulación de la diferenciación de los OPCs (a través del bloqueo de los receptores muscarínicos M1/M3) y la efectiva generación de la vaina de mielina alrededor de los axones desnudos, con la correspondiente disminución del daño axonal y la recuperación funcional.

Por otra parte, no debemos olvidar la posibilidad que ofrece la terapia celular para el desarrollo de estrategias de remielinización, mediante el trasplante de OPCs o NSCs, un campo todavía por explorar. A día de hoy, sólo se ha llevado a cabo un ensayo clínico de trasplante de células madre del SNC en niños con la enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher (leucodistrofia hipomielinizante causada por la mutación en el gen *plp1*) con resultados no concluyentes en cuanto a mielinización comprobada por MRI (Gupta et al., 2012). Sin embargo, la variabilidad de las lesiones de EM y el ambiente inflamatorio al que se enfrentarían las células transplantadas supone el mayor desafío para la efectividad de la terapia. Además, el acceso a OPCs humanos viables y en número suficiente para este tipo de terapias ha llevado al desarrollo de protocolos de obtención de oligodendrocitos derivados de la recientemente implantada tecnología de células madre pluripotentes inducidas (iPS, *induced pluripotent stem cells*, en inglés; Ehrlich et al., 2017).

Las MDSCs constituyen una población heterogénea de células inmaduras de linaje mieloide con alta capacidad inmunosupresora, cuyo papel en enfermedades como cáncer, sepsis e infecciones ha sido ampliamente descrito. En los últimos años, el papel inmunosupresor y antiinflamatorio de las MDSCs ha ido cobrando importancia en el control de la respuesta inmune de enfermedades autoinmunes. Entre ellas, la EM es una enfermedad paradigmática del SNC que conlleva una respuesta autoinmune y desmielinización, cuya variante clínica más frecuente es la remitente-recurrente, caracterizada por fases de incremento de síntomas seguidos de períodos de remisión. Para que la transición entre las dos fases sea efectiva, debe englobar tanto mecanismos de limitación de la respuesta inmune como de reparación del tejido y potenciación de la remielinización. Estos dos componentes patológicos se encuentran intrínsecamente relacionados durante los episodios de mayor afectación neurológica, de tal forma que el aislamiento de ambos para su estudio pormenorizado resulta de una gran complejidad. Tomando ventaja de uno de los modelos más utilizados para el estudio en su conjunto de la EM, la EAE, nuestro grupo y otros han descrito la participación de las MDSCs en la transición de la fase de incremento de síntomas al período de remisión. Su infiltración en el sistema nervioso central junto con otras poblaciones inmunes y la puesta en marcha de su principal mecanismo de acción a través de la supresión de los linfocitos

T permite un control al menos parcial de los procesos inflamatorios. Esta función está íntimamente ligada al grado de inmadurez que las MDSCs conserven durante la ventana temporal de la fase de incremento de síntomas, presentando una alta plasticidad en función del ambiente inflamatorio circundante. Conservando las mismas marcas fenotípicas (Bronte et al., 2016), se ha demostrado que las MDSCs pueden actuar como células presentadoras de antígeno en el momento de inicio de síntomas, transformándose en células altamente inmunosupresoras durante el momento de máxima afectación (Moliné-Velázquez et al., 2014; Zhu et al., 2011), abriendo por lo tanto las puertas para su modulación farmacológica. Esta misma plasticidad se ha demostrado en otras poblaciones inmunes, señalando al ambiente inflamatorio como un factor clave en la función proinflamatoria (respuesta M1) o anti-inflamatoria (respuesta M2). Además, el viraje funcional hacia esta activación alternativa se ha relacionado con efectos neuroprotectores y regeneradores sobre la biología celular de las células encargadas de la producción de mielina, los oligodendrocitos y sus precursores u OPCs (Dombrowski et al., 2017; El Behi M. et al., 2017; Miron et al., 2013; Miron and Franklin, 2014), favoreciendo su llegada al área lesionada y su diferenciación hacia fenotipos maduros y mielinizantes. Sin embargo, la contribución que las MDSCs puedan tener sobre la supervivencia, migración, proliferación y diferenciación de los OPCs está aún por explorar.

Por todo ello, y puesto que está demostrada la relación entre la presencia de las MDSCs y la remisión de síntomas, nos propusimos explorar qué mecanismos intervenían en esta transición, así como la posibilidad de una conexión directa entre su contenido tanto periférico (órganos inmunes) como central (parénquima del

SNC) con el grado de destrucción/regeneración tisular y las consecuencias a nivel clínico.

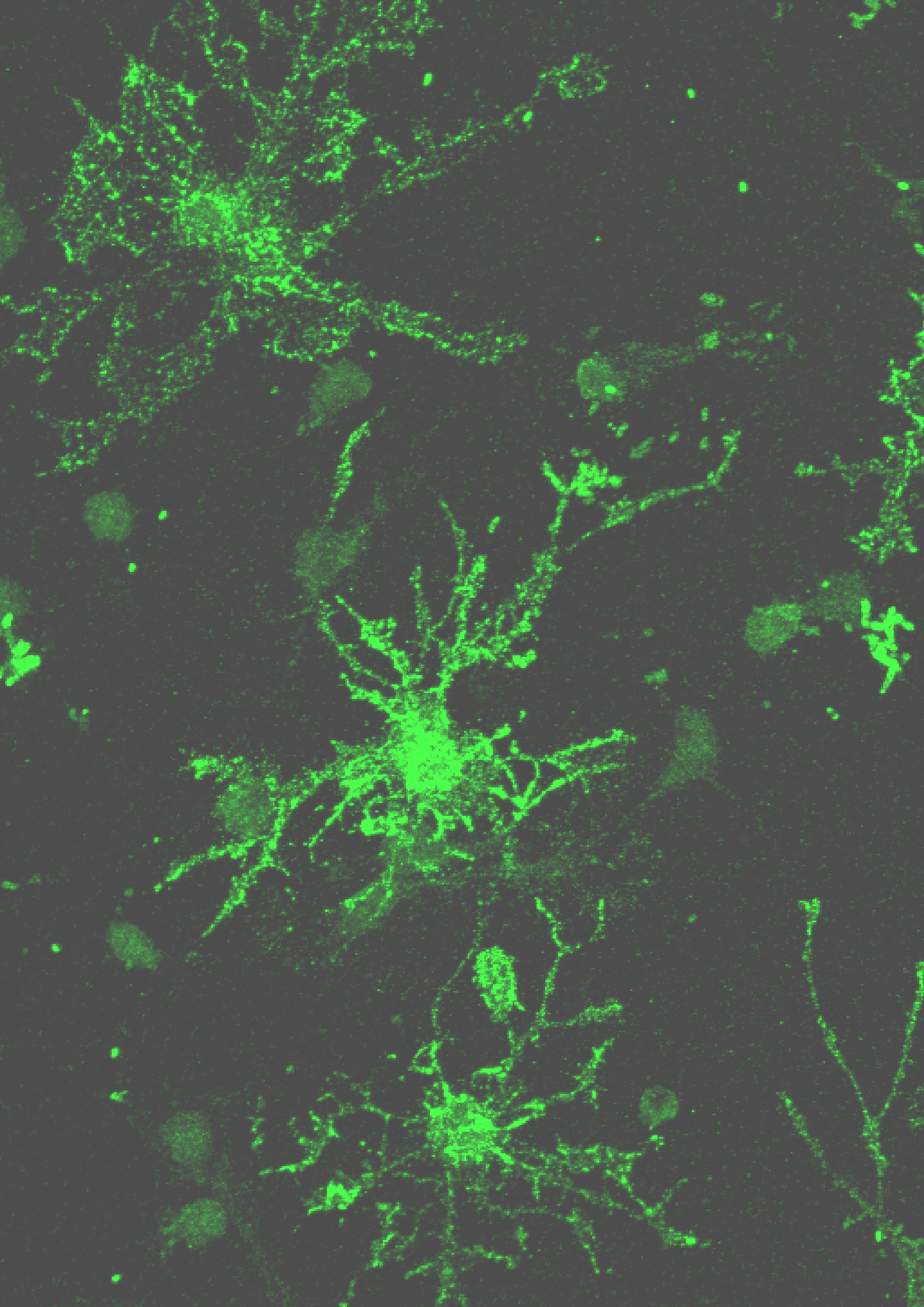
Por tanto, este trabajo encaminado a la obtención del título de doctor se llevó a cabo bajo la siguiente hipótesis:

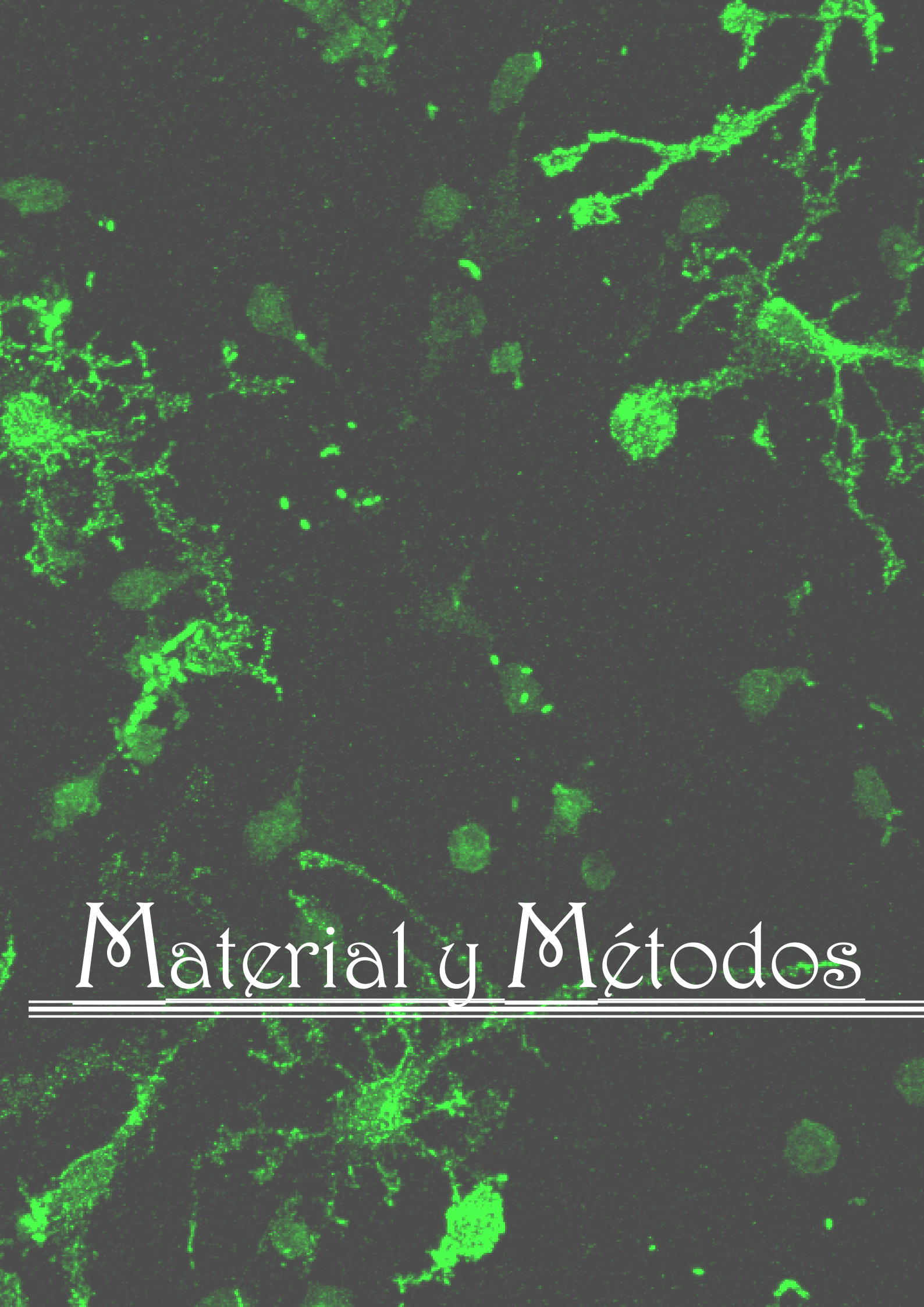
“La modulación de las MDSCs con tratamientos ya existentes para esclerosis múltiple podría favorecer no sólo la inmunosupresión y polarización de un ambiente proinflamatorio a uno antiinflamatorio, sino acelerar la reparación de lesiones previamente establecidas. Además, el estudio de su abundancia periférica y la relación que ésta tiene con la evolución de la EAE podría sentar las bases para el establecimiento de su uso como indicador de severidad de la enfermedad, lo que podría aportar un enfoque novedoso para la elección de la estrategia terapéutica más adecuada. Por otra parte, el estudio de la relación de MDSCs con las células mielinizantes del SNC permitirá abordar su efecto oligoprotector y regenerador en la esclerosis múltiple mediante una acción indirecta a través de la supresión periférica y local de los linfocitos T que provocan la destrucción de mielina y el posterior daño axonal; y directa a través de la secreción de moléculas que favorecen la supervivencia, proliferación, migración a lesión y diferenciación a fenotipos mielinizantes de los OPCs.”

Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

OBJETIVOS

1. Estudiar la modulación farmacológica de las MDSCs en el modelo de EAE utilizando uno de los fármacos de primera línea para el tratamiento de EM, el IFN- β , atendiendo a su contenido periférico y central, así como profundizand en los mecanismos de inmunosupresión sobre los linfocitos T.
2. Investigar la relevancia del porcentaje de MDSCs como indicador de severidad clínica y establecer su relación con desmielinización y daño tisular.
3. Estudiar los efectos de las MDSCs sobre la biología de los OPCs en términos de supervivencia, proliferación, migración y diferenciación; así como en procesos de remielinización.





Material y Métodos

Todos los animales utilizados para esta Tesis Doctoral fueron ratones de la especie *Mus musculus*, de distintas cepas, edades, sexo y procedencia según el experimento (Tabla 2). Para los experimentos de los tres objetivos que implicaban inducir la EAE, así como para su uso como control, se utilizaron ratones hembra de la cepa C57/BL6J, con diversas procedencias para las distintas partes del estudio . y de 7 semanas de edad. Esta misma cepa se utilizó para los experimentos de remielinización del tercer objetivo, en este caso utilizo animales de ambos sexos de forma indistinta y de 7 días de edad (P7). Para los experimentos que implicaban cultivos primarios de OPCs en el tercer objetivo se utilizaron ratones de la cepa CD1 de 0 días de edad (PO).

Los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con la regulación española (RD 53/2013) y europea (2010/63/UE) de manejo de animales de experimentación, y fueron aprobados por el Órgano Habilitado, en el caso del objetivo número 1 por el Comité de Ética para el Bienestar Animal del Hospital Regional Carlos Haya (Málaga, España) y el Comité para el Bienestar Animal del Hospital Nacional de Paraplégicos (SAPAO01, Toledo, España). En el caso del objetivo 2 se aprobó por el Comité para el Bienestar Animal del Hospital Nacional de Paraplégicos; y en el caso del objetivo 3, por éste último y por el Órgano Habilitado- Comité de Ética del CSIC (440/2016, Madrid, España).

» Número de animales

Objetivo #1

Para el estudio de la potenciación farmacológica de la población esplénica de MDSCs mediante IFN- β en bazo y SNC se utilizaron 11 ratones en total procedentes de la casa comercial Charles River Laboratories International, Inc. (Barcelona, Spain), todos ellos inmunizados para generar el modelo de EAE: a 7 de ellos se les administró en dosis única IFN- β murino recombinante (para más información, ver epígrafe 3) y a 4 de ellos suero fisiológico salino. Los animales fueron sacrificados siempre a los tres días de la administración de la dosis única. El mismo procedimiento se llevó a cabo para el estudio de potenciación de la capacidad inmunosupresora in vitro de MDSCs extraídas de ratones tratados con IFN- β o vehículo. En este caso, se utilizaron 6 animales procedentes del animalario del Hospital Nacional de Paraplégicos, a los que se les indujo la EAE divididos en dos grupos de 3. Además, se utilizaron 6 ratones C57/BL6 de la misma procedencia sin inmunizar para el aislamiento de los linfocitos T.

En el caso del estudio temporal de la diferenciación de las MDSCs en cultivo y co-cultivo, tratadas con IFN- β o vehículo, se utilizaron 10 ratones procedentes de Envigo (Huntingdon, Reino Unido) a los que se les inmunizó para el modelo de EAE, junto con 10

ratones C57/BL6 de la misma procedencia sin inmunizar para el aislamiento de los linfocitos T.

Objetivo #2

Para el estudio de la relación entre el contenido esplénico de MDSCs y los datos clínicos obtenidos se utilizaron 20 ratones procedentes del animalario del Hospital Nacional de Paraplégicos inducidos con la enfermedad. En cuanto al análisis de tejido, se utilizaron 12 ratones elegidos aleatoriamente del grupo anteriormente mencionado para el estudio de desmielinización, daño axonal y apoptosis de linfocitos T.

Objetivo #3

Para el estudio de los efectos neuroprotectores

de las MDSCs sobre la oligodendroglía en cultivos primarios, se utilizaron las camadas a P0 de 30 hembras gestantes procedentes del animalario del Instituto Cajal. Para los estudios de remielinización en cultivos organotípicos de rodajas de cerebelo se utilizaron las camadas a P7 procedentes de aproximadamente 10 hembras gestantes. Para el cálculo del número de animales utilizados se tiene en cuenta las pruebas realizadas para la necesaria puesta a punto de la técnica.

A las dos tipos de cultivos se añadieron medios condicionados de MDSCs procedentes de 15 ratones a los que se les indujo la EAE en el animalario del Hospital Nacional de Paraplégicos.

Objetivo	Uso	Cepa	Edad	Sexo	Número	Procedencia	Lugar de uso
1	EAE	C57/BL6	7 semanas	Hembra	11	Charles River	HRCH
					16 + 16 sin inmunizar	~ Envigo ~Animalario HNP	HNP
2	EAE	C57/BL6	7 semanas	Hembra	20	~Animalario HNP	HNP
3	Cultivo OPCs	CD1	P0	N.d	30 hembras gestantes aprox.	Animalario IC Animalario CAM	IC CAM
	Cultivos organotípicos	C57/BL6	P7	N.d	15 hembras gestantes aprox.	Animalario IC	IC
	EAE para obtención de medios condicionados	C57/BL6	7 semanas	Hembra	20	~ Animalario HNP ~ Janvier	HNP/IC

Tabla 3. Características de los animales utilizados para todos los procedimientos. Abreviaturas: CAM= Universidad de Cambridge; EAE= encefalomiелitis autoinmune experimental; HNP= Hospital Nacional de Paraplégicos; HRCH= Hospital Regional Carlos Haya; IC= Instituto Cajal; N.d= no determinado. Para el resto de abreviaturas referirse al texto.

2. Inducción y evaluación del modelo de EAE

En el caso de los animales con procedencia externa al animalario del Hospital Nacional de Paraplégicos, fueron aclimatados previamente a la realización del procedimiento durante una semana en las condiciones ambientales adecuadas (50-60% de humedad relativa, temperatura de 20-24 °C, 15 cambios de ventilación por hora y ciclos de luz/oscuridad de 12-14 horas), y en todo caso su alimentación durante todo el período de estabulación fue ad libitum.

La realización del procedimiento se llevó a cabo en todo caso en horario de mañana y en la sala de cirugía específica y exclusiva de ratón. En la siguiente tabla se puede encontrar un listado del material necesario para el procedimiento.

Previamente a la entrada en el animalario, se prepararon las soluciones necesarias para la inducción de la EAE en condiciones estériles en la campana de flujo laminar. En primer lugar, se preparó la disolución que contenía el péptido-fragmento 35-55 (M-Q-V-G-W-Y-A-S-P-F-S-A-V-V-H-LY-A-N-G-K) de MOG. Para ello, se pesó y disolvió a una concentración de 200 µg por ratón en 100 µl de PBS estéril 1X. El adyuvante incompleto de Freund (IFA, Difco) se completó con de partículas inactivadas de *Mycobacterium tuberculosis* (Difco) para llegar a una concentración de 4 mg/ml, obteniendo el coadyuvante completo de Freund (CFA). La toxina pertúsica (Sigma) se preparó a una concentración de 250 ng por ratón en 100 µl de PBS estéril 1X. Todas las soluciones se terminaron de preparar con ayuda de un vórtex.

Una vez transcurrido el período de aclimatación, los animales (estabulados a un máximo de 5 animales por jaula) fueron

Compuesto	Casa comercial	Concentración	Uso
MOG	GenScript HK Limited (Hong Kong)	2 mg/ml	Día de la inmunización
Toxina pertúsica	Sigma	2,5 ng/µl	Día de la inmunización y a 2 dpi
CFA: Adyuvante incompleto de Freund + Partículas inactivadas de <i>M. Tuberculosis</i>	Sigma H37RA Difco	4 mg/ml	Día de la inmunización
Ketolar® (ketamina)	Pfizer	37 mg/kg	Día de la inmunización
Xilagesic 20%®(xilacina)	Calier	5,5 mg/kg	Día de la inmunización

Tabla 4. Resumen de reactivos utilizados para la inmunización.

trasladados a la sala de cirugía. Una vez allí, fueron anestesiados por vía intraperitoneal con 40 μ l de una mezcla de anestésico/analgésico que contenía Ketolar® y Xilagesic®, respectivamente. Para ello, se inmovilizó al ratón manteniéndolo inclinado con la cabeza hacia el suelo para evitar la inyección en órganos abdominales, y se le administró la mezcla de anestesia/analgesia en el cuadrante inferior derecho, lateral a la línea media para evitar la inyección en la vejiga urinaria, y al 2 cm caudal a la última costilla para evitar la inyección en el hígado (lado derecho) o en el estómago (lado izquierdo). Para evitar la hipotermia, los animales fueron manipulados a partir de este momento sobre una manta térmica a 37 °C durante todo el proceso.

Para preparar la emulsión de CFA y MOG se utilizó una llave de tres vías (Sendal) o “codillo”, conectando dos jeringuillas de 2 ml (BD Emerald) con un volumen igual de cada reactivo, según el número de ratones a inmunizar, previamente agitados vigorosamente con el vórtex. Manteniendo la llave girada (ver esquema) se pasaba primero el CFA (de consistencia más densa) y a continuación, abriendo la llave para ambas entradas, el MOG. Sujutando la llave con ambas manos, se pasaban las soluciones de una jeringuilla a otra hasta obtener una emulsión blanquecina de consistencia espesa. Para saber si la emulsión tenía la consistencia necesaria, se comprobaba en un vaso con

agua al que se añadía una gota de emulsión; si la gota se quedaba compacta y no se dispersaba, la emulsión estaba lista para ser inyectada.

Así, se llenó una jeringuilla de 1 ml (Shalix) con la emulsión y se inyectó de forma subdérmica 200 μ l de solución en cada animal repartida a partes iguales (50 μ l) en cada ingle y axila (figura 6).

Para ello, con el ratón colocado con la parte dorsal hacia la manta térmica, se realizó un pliegue en cada una de estas áreas con los dedos índice y pulgar. A continuación, se introdujo la aguja en el

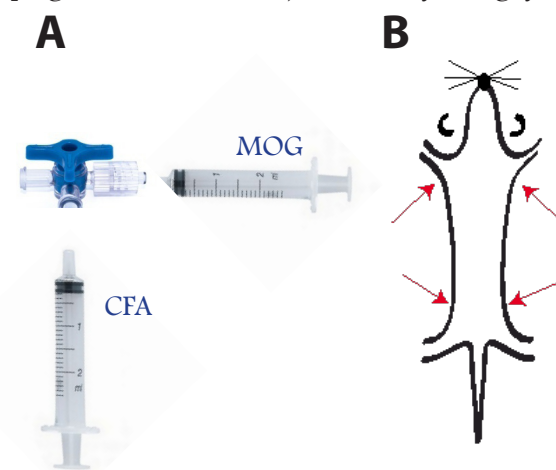


Figura 11. Esquema representativo del procedimiento de la EAE. A: Preparación de la emulsión de MOG y CFA mediante el uso de un codillo. B: Zonas de inyección de la emulsión.

pliegue de forma vertical y se inyectó la emulsión. La correcta inyección del líquido se comprobó mediante la observación y el tacto de un pequeño abultamiento de la zona. La aguja se retiró del pliegue después de una breve espera y girándola para no perder líquido. Cada ratón inyectado se colocaba con la parte ventral hacia la manta para evitar el ahogamiento y facilitar la recuperación.

Después de la inyección del MOG, se

procedió a la administración intravenosa en una de las venas laterales de la cola de la toxina pertúsica (Sigma, procedente de Bordetellapertussis) a una concentración de 2,5 ng/μl. Para ello, se introducía al ratón en un cepo de inmovilización (Cibertec), con la cola libre para su manipulación. La dilatación de la vena se realizó mediante la aplicación de calor sujetándola entre las manos del investigador. La toxina pertúsica se administró tanto el día de la inmunización como 48 horas después.

Una vez terminado el procedimiento los animales eran devueltos a la jaula y colocados con la parte ventral hacia abajo dentro de un material aislante para evitar la pérdida de calor, y se les mantenía sin agua 5 horas, para facilitar la recuperación de la anestesia. Tanto su peso como su estado de salud eran comprobados de forma diaria desde ese día hasta el momento de su sacrificio.

El día de la inmunización establecía el comienzo de la cronología del curso clínico; a partir de este momento, se contaba el tiempo en “días post-inmunización” (dpi). La evaluación diaria se llevó a cabo por dos investigadores de forma visual, a doble ciego y en la misma hora y lugar, siguiendo los criterios establecidos por el laboratorio en base a la literatura, dyo la siguiente puntuación de afectación: 0= asintomático; 0,5= parálisis de la parte distal de la cola; 1= pérdida de tono muscular en toda la cola; 1,5= cola flácida y ligera debilidad en las patas traseras; 2= debilidad manifiesta en las patas traseras; 2,5= parálisis total unilateral de una extremidad trasera; 3=

parálisis bilateral de las extremidades traseras y debilidad en las delanteras; 3,5= paraplejia y parálisis unilateral de la extremidad delantera; 4= tetraplejia; 4,5= animal moribundo y 5= muerte.

Los ratones se valoraron todos los días a doble ciego, desde el momento de la inmunización hasta el sacrificio, recogiendo el dato de peso y evaluo la puntuación que alcanzaban en la escala clínica. Con estos datos se generó la siguiente relación de parámetros clínicos: pérdida de peso, puntuación máxima (“pico” en adelante), días desde el debut hasta la puntuación máxima y puntuación acumulada. Además, se estableció un parámetro denominado “índice de agresividad” de la enfermedad (*aggressiveness index*, AI, por sus siglas en inglés), que establece la relación entre la puntuación máxima del pico y los días que tarda en llegar al pico.

Siguiendo la normativa y la ética sobre experimentación animal, se aplicó el criterio de las 3Rs (reemplazo, reducción y refinamiento) durante todo el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Además, se establecieron los siguientes criterios de punto final: sería sacrificado todo animal que alcanzase una puntuación en la evaluación clínica igual o superior a 4; o que se mantuviese con un 3 durante más de 48 horas; o que presentase signos de dolor o estrés durante más de 48 horas aunque la puntuación fuese inferior a 3, tomados como tales verbalizaciones, presentación de estererotipias, lordocifosis, pérdida de pelo o pérdida de peso superior a 2 g/día. Ninguno de los signos del tercer supuesto apareció en ninguna

de las tandas realizadas para los experimentos de esta Tesis Doctoral, y ningún ratón alcanzó una puntuación máxima superior a 3,5.

3. Tratamiento con IFN- β

Para el estudio de la potenciación farmacológica de las MDSCs, se administró una dosis única de 10.000 unidades (40 ng) de IFN- β recombinante murino (*Mouse Interferon Beta, mammalian, carrier-free*, PBL Interferonsource, Piscataway, NJ, USA) de forma intraperitoneal o suero salino fisiológico (vehículo) en una única inyección de 200 μ l, desde el momento en el que los ratones presentaban una puntuación de afectación clínica entre 0,5 y 1,5 (ambos inclusive); y fueron sacrificados por dosis letal de pentobarbital (Dolethal®, Vétoquinol) a los tres días.

4. Citometría de flujo y cultivo de células del bazo

Tanto para el análisis de poblaciones esplénicas como para la selección y posterior cultivo de linfocitos T y MDSCs, se extrajeron los bazos de ratones control y EAE, de forma previa a la fijación (en el caso de que el mismo ratón se utilizase para el estudio del tejido del SNC), a las 7 semanas de edad y en el momento descrito anteriormente para cada experimento.

» Procesado de bazo

Para la extracción del bazo, se inyectó a los ratones una dosis eutanásica de 100 μ l de Dolethal® intraperitonealmente. Una vez anestesiados, se les realizó una incisión longitudinal con tijeras de disección en la parte lateral derecha del abdomen para exponer la zona de extracción. A continuación, se retiró el tejido muscular y adiposo, se extrajo el bazo procurando eliminar cualquier rastro de grasa circundante, y se recogió en medio de cultivo RPMI (Gibco) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (SBF; Gibco) previamente inactivado (a 55°C durante 30 minutos) y filtrado, y un 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma). Cada bazo extraído se colocó en un filtro de 40 μ m (BD Biosciences) sobre un tubo falcon de 50 ml (Sarstedt) y se disoció mecánicamente mediante la presión del tejido con la parte distal del émbolo de una jeringa de 2 ml (BD Biosciences) contra el filtro (ver esquema). A continuación, se hizo pasar dos veces 5 ml de RPMI suplementado por el filtro para recoger el mayor número posible de células. La suspensión celular se centrifugó a 145 g durante 5 minutos en un centrífuga de rotor basculante (Heraeus) y el pellet se resuspendió en un tampón de lisis para eliminar los hematíes, que contenía 0,15 M de NH_4Cl , 9 mM de HCO_3K y 0,1 M de EDTA en agua destilada, durante 1 minuto en hielo. Inmediatamente después, la reacción se paró añadiendo el volumen restante hasta 50 ml de PBS 1X estéril (Gibco) frío. Tras otra centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos,

el pellet se resuspendió en 10 ml de tampón fosfato salino 1 X (PBS 1X) frío para proceder al recuento de las células obtenidas utilizando un hemocitómetro o cámara de Neubauer (Brand). Para ello, y debido al alto número de células que se preveía obtener de un bazo, se realizó una dilución 1:10 en PBS 1X frío y otra 1:2 en azul de Tripan (Trypan Blue, Gibco, marcador de células muertas) y se utilizaron 10 µl para el recuento.

» Marcaje de poblaciones esplénicas

En los casos en los que se precisaba el análisis de los marcadores de poblaciones esplénicas a partir del bazo total, se separaron 2 x 10⁶ células y se resuspendieron en 50 µl de PBS 1X suplementado con 10 % FBS (Gibco, inactivado por calor), 25 mM de HEPES (Gibco) y 2 % de P/S, y los receptores de la fracción constante (FCR, *Fc receptor*; en inglés) fueron bloqueados durante 10 minutos a 4 °C con anticuerpos anti-CD16/CD32 (BD Biosciences) a una concentración de 10 µg/mL. Después del bloqueo, a la suspensión celular y el bloqueo de FCR se añadieron 50 µl que contenían los anticuerpos necesarios para el análisis de dos tipos de poblaciones, las poblaciones linfoides y mieloides, y se incubó durante 30 minutos a 4°C en oscuridad y agitación. El panel de poblaciones linfoides constaba de los siguientes anticuerpos: anti-CD3-PB, anti-CD4-PE, anti-CD8-FITC, anti-CD25- y anti-CD69-APC. El panel de células mieloides constaba de los siguiente anticuerpos: anti-CD11b-PerCP-Cy5.5, anti-Ly-6C-FITC, anti-Ly-6G-PE, anti-CD11c-APC, anti-MHC-II y

anti-F4/80-Fluor450 (Tabla 5). A continuación, se añadieron 400 µl de PBS suplementado como anteriormente se ha descrito y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos para lavar el anticuerpo. El pellet resultante se resuspendió en 50 µl de PBS suplementado y se pasó por el citómetro de flujo FACS Canto II (BD, Biosciences) y su posterior análisis con el software FACS Diva 6.1 y FlowJow 7.6.4 software (TreeStar Inc.).

En el caso de las células recogidas tras su cultivo en placas de 96 pocillos para su análisis, se recogió el medio de cada pocillo tras varias resuspensiones cuidadosas con la pipeta en tubos independientes por condición. A continuación, se realizaron dos lavados con PBS 1X frío para recuperar el mayor número posible de células y se añadieron al mismo tubo. La suspensión celular se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y a continuación se procedió al bloqueo, marcaje y análisis como se ha descrito anteriormente en este epígrafe.

» Aislamiento de MDSCs, cultivo y tratamientos

Para los experimentos en los que se requería el aislamiento de MDSCs para su cultivo, se procesó el bazo como se ha descrito. Una vez obtenida la suspensión celular y realizado el recuento, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. Se realizó el bloqueo del FCR con anticuerpos anti-CD16/32) durante 10 minutos a 4°C en agitación y oscuridad en PBS suplementado, y posteriormente se marcó con

los anticuerpos necesarios para el aislamiento: anti-CD11b-PerCP-Cy5.5, anti-Ly-6C-FITC y anti-Ly-6G-PE, durante 30 minutos en las mismas condiciones. A continuación, se añadieron 400 μ l de PBS suplementado y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos para lavar el exceso de anticuerpo y el pellet resultante se resuspendió en 500 μ l de PBS suplementado y se pasaron por el citómetro de flujo FACS Aria (BD Biosciences) a una densidad de $5 - 10 \times 10^6$ células/mL.

Previamente al día del experimento, el aparato había sido calibrado según los protocolos establecidos. Para ello, se realizaron controles de compensación para separaciones multiparamétricas (como en este caso, puesto que se utilizan tres anticuerpos) utilizando el kit ComBeads (BD Biosciences) de ratón, rata y hÁEMter, según el anticuerpo. Además, para establecer las regiones positivas se realizaron controles con todas las combinaciones de anticuerpos menos uno (FMO, *fluorescence minus one*, en inglés). Utilizando el software FACS Diva 6.1, se seleccionó la población Ly-6C^{high}Ly-6G^{-/low} a partir de la población parental CD11b⁺ y se procedió a la separación celular en condiciones de baja presión (a 35 psi, del inglés *pounds per square inch* y boquilla de 70 μ m), con una pureza en el proceso de separación siempre mayor del 95 % y manteniendo el flujo entre 4.000 y 6000 eventos por segundo.

Los dos aparatos de citometría de flujo (FACS Canto II y FACS Aria) estaban equipados

con tres láseres, de 405-407, 488 y 633 nm.

La preparación y mantenimiento de los equipos, así como el pase de las muestras y la separación celular se realizó por parte del Servicio de Citometría del Hospital Nacional de Paraplégicos.

Una vez obtenidas las MDSCs en un tubo de 15 ml que contenía suero fetal bovino (Gibco) suplementado con P/S al 1% y 25 mM de HEPES, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, se resuspendieron en medio IMDM (BioWest) suplementado con 10% de FBS (Gibco), 1% de P/S (Gibco), 50 μ M de β -mercaptoetanol (Sigma) y 2 mM de L-glutamina (Gibco). Las células se sembraron en pocillos de placas de 96 pocillos de fondo plano (Sarsted) en un volumen final de 100 μ l, a diferentes densidades según el experimento, como se detalla a continuación:

1) Extracción de medios condicionados:

Se sembraron las MDSCs a una densidad de 172.000 células/cm² (5 x 10⁴ células por pocillo), y se cultivaron durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se recogió el volumen de todos los pocillos en un tubo de 2 ml de volumen total y se centrifugó a 145 g durante 5 minutos para evitar la presencia de restos celulares en el medio condicionado. Del sobrenadante se hicieron alícuotas y se congelaron a -80°C hasta su uso.

2) Tratamiento con IFN- β de MDSCs y co-cultivo con linfocitos T

Para el estudio del efecto del IFN- β sobre el fenotipo de las MDSCs, las células aisladas

de ratones en el pico de la EAE se cultivaron a una densidad de 172.000 células/cm² y se trataron con IFN- β (1000 U/mL, preparado en suero salino) o vehículo (suero salino) durante 18 horas. Transcurrido ese tiempo, el medio de cultivo fue retirado y se reemplazó por medio de cultivo nuevo atemperado, o linfocitos T no estimulados o policlonalmente estimulados en el caso del co-cultivo, para continuar en cultivo durante otras 48 horas. Las células se recogieron para su análisis a diferentes puntos temporales a lo largo del cultivo (0, 6, 18 y 72 horas), por centrifugación a 2000 rpm a RT, lavadas en PBS 1X y procesadas para el panel de células mieloides.

» Aislamiento de linfocitos T, cultivo y estimulación

Para el aislamiento y cultivo de linfocitos T, se procesó el bazo de un ratón hembra C57BL/6 sin inmunizar. Tras el bloqueo del FCR, se procedió al marcaje de los esplenocitos obtenidos con el anticuerpo anti-CD3-PB (BD Biosciences). A continuación, se añadieron 400 μ l de PBS suplementado y se centrifugó la suspensión celular a 2000 rpm durante 5 minutos para eliminar el exceso de anticuerpo. El pellet resultante se resuspendió en 500 μ l de PBS suplementado y se pasó por el citómetro de flujo FACS Aria. Después de los pertinentes controles, y utilizando nuevamente el software FACS Diva 6.1, se seleccionó la población que se encontraba dentro de la región CD3⁺ y se procedió a la

separación celular en condiciones de baja presión (a 35 psi, del inglés pounds per squareinch y boquilla de 70 μ m), con una pureza en el proceso de separación mayor del 95 % y manteniendo el flujo entre 4.000 y 6000 eventos por segundo.

Para la activación policlonal de linfocitos T, se realizó un tapizado del fondo de los pocillos de la placa de p96 con los anticuerpos anti-eCD3 y anti-CD28 purificados a una concentración de 1 μ g/mL en PBS 1X estéril, de manera que se activase el receptor de linfocitos T (TCR, T cell receptor, en inglés) de la superficie de los linfocitos T, con la subsiguiente señalización intracelular. Para ello, la placa fue tratada con 50 μ l de la solución acuosa con los dos anticuerpos, durante 3 horas, a 37 °C. Transcurrido este tiempo, los pocillos se lavaron dos veces con PBS 1X estéril para eliminar el exceso, evityo en todo momento que se secaran.

Una vez obtenidas las células del citómetro de flujo en tubos de 15 ml con FBS suplementado con P/S al 1% y HEPES a 25 mM, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min y se resuspendieron en el medio de cultivo que contenía RPMI 1640 (Gibco) suplementado con L-glutamina a 2 mM, 1% de P/S y 5% de FBS. A continuación, se dispusieron 690.000 células/cm² (2 x 10⁵ células por pocillo) en placas de 96 pocillos, tanto en pocillos tapizados (en adelante, “estimulados”) como sin estimular (“no estimulados”) con mezcla de anticuerpos para la activación, y se cultivaron durante 24 -para el experimento in vivo- o 14 horas -para el experimento *in vitro*- hasta el co-cultivo con las MDSCs. Previamente al experimento, se comprobó

tanto la supervivencia como la activación de los linfocitos T en cultivo. Para estudiar la supervivencia, se llevaron a cabo análisis de ciclo celular (como se explicará más adelante) y para estudiar la activación se marcaron las células de pocillos tratados y sin tratar con el panel de células linfoides, tomando como referencia los marcadores de activación CD25 y CD69.

» Ensayos de inmunosupresión en los co-cultivos de MDSCs y linfocitos T

Para estudiar la potenciación funcional de las MDSCs con IFN- β , se realizaron ensayos de inmunosupresión *in vitro* en co-cultivo con los linfocitos T. En el caso del tratamiento *in vivo* con el fármaco, las MDSCs extraídas de ratones EAE a los tres días de la administración del fármaco (o del vehículo) fueron centrifugadas a 145 g durante 5 minutos. El pellet celular resultante se resuspendió en el volumen proporcional de los pocillos en los que se encontraban los linfocitos T -estimulados o no- durante 24 horas teniendo en cuenta la relación de MDSCs: linfocitos T establecida, es decir 5×10^4 MDSCs por cada 2×10^5 linfocitos T (1:4). La suspensión celular resultante se volvió a sembrar en los pocillos en los que se habían cultivado los linfocitos T correspondientes y el co-cultivo se mantuvo durante 48 horas, tras las cuales se recogieron todos los pocillos para el análisis de ciclo celular.

En el caso del tratamiento *in vitro*, los linfocitos T -estimulados o no- cultivados durante 14 horas se recogieron de la siguiente

forma: de cada pocillo se recogió en un tubo eppendorf el medio con el mayor número posible de células tras varios pipeteos cuidadosos; a continuación, se lavó el pocillo dos veces con PBS 1X frío, recuperando el líquido en otro eppendorf, para después centrifugarlo a 2000 rpm durante 5 minutos. El pellet resultante se resuspendió con el medio (más células) del primer eppendorf y se añadió a un pocillo de las MDSCs cultivadas como se ha descrito en el anterior epígrafe, tras haberles retirado el medio. El co-cultivo se mantuvo 48 horas, tras las cuales las células se recogieron para el análisis del ciclo celular.

Para el análisis del ciclo celular, las células se recogieron en tubos eppendorf y el pocillo se lavó dos veces con PBS 1X frío para recuperar el mayor número posible de células. La suspensión celular se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos, y el pellet se resuspendió en 300 μ l de PBS 1X frío y se pasó cada muestra a un tubo falcon de 15 mL. A continuación, se fijaron las células mediante la adición de 700 μ l de etanol al 70 % (previamente enfriado a -20°C), gota a gota y por la pared, manteniendo los tubos en agitación suave con la ayuda de un vórtex. Las muestras se guardaron a -20°C y al día siguiente se marcaron con ioduro de propidio libre de RNasa (Immunostep), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la adquisición y análisis se utilizó el citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences), capturando para cada muestra un mínimo de 30.000 eventos, y el ciclo celular se analizó utilizando el software FACS Diva 6.1 y FlowJow 10.2. La adquisición

y el análisis se realizaron en el Servicio de Citometría del Hospital Nacional de Parapléjicos.

5. Procesado de tejido nervioso para histología

La extracción y procesado del tejido nervioso se llevó a cabo siempre en el pico de máxima afectación clínica para el estudio de la agresividad, y a los tres días de la administración del fármaco en el caso del estudio del IFN- β . En primer lugar, se preparó la solución de paraformaldehído

(PFA, Sigma) al 4% en tampón fosfato 0,1 M, pH= 7,4 (PB) con la que se iba a realizar la perfusión transcardiaca, solución que siempre se preparó el mismo día de la perfusión. Además, se montó la bomba peristáltica, con tres gomas: dos de entrada a la bomba, una procedente de un vaso de precipitados con PFA y otra con la solución de lavado (PBS 1X); y otra unida por una palometa a una aguja roma, que será la que se utilice para pinchar el corazón. Tras administrarle al ratón una dosis eutanásica de Dolethal® y esperar a que ésta hiciera efecto, se colocó al ratón con la vista ventral hacia arriba y con las extremidades sujetas a una

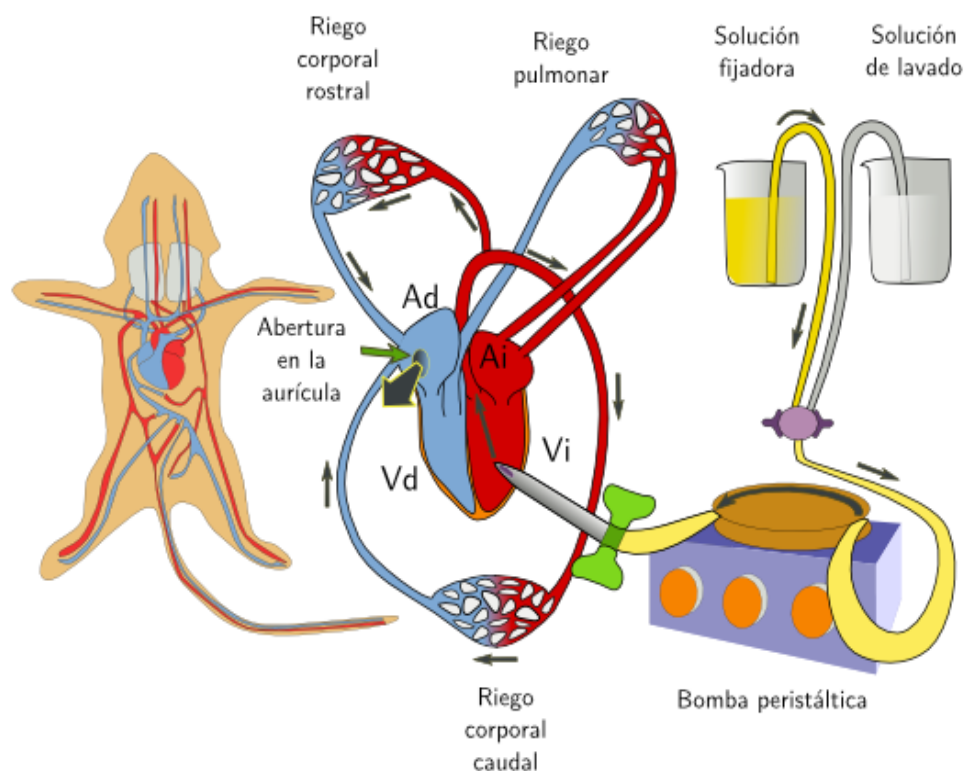


Figura 12. Esquema del procedimiento de perfusión transcardiaca. Imagen tomado de <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/2-metodos-fijacion.php>.

bandeja de perfusión con poliespán. Se realizó un corte en la parte abdominal baja cerca de la línea media para posteriormente practicarle una laparotomía y extraerle el bazo, cuyo era necesario.

A continuación se practicó una toracotomía, lo que permitió el acceso al corazón. Para poder trabajar más cómodamente, el cartílago del esternón se pinzó con un mosquito y se retiró de la zona de manipulación. Con unas tijeras de microdisección se realizó un corte en la aurícula derecha para permitir la salida de la sangre junto con el fijador. A continuación, se realizó una incisión en el ventrículo izquierdo con una cánula roma de forma horizontal y hasta la entrada de la aorta, sujetando la cánula con unas pinzas a través del tejido cardíaco para evitar desplazamientos. En este momento se enciende la bomba peristáltica, y se hace pasar en primer lugar solución de lavado durante 3 minutos para proceder al lavado del sistema circulatorio y posteriormente, el líquido fijador (PFA al 4%) durante 5 minutos (Fig. 7). La bomba peristáltica se programó para generar un flujo constante de 18 ml/min.

La perfusión se consideraba un éxito cuyo la rigidez de la cola y las extremidades era total, y se veía reflejado en una mayor consistencia de los tejidos blandos.

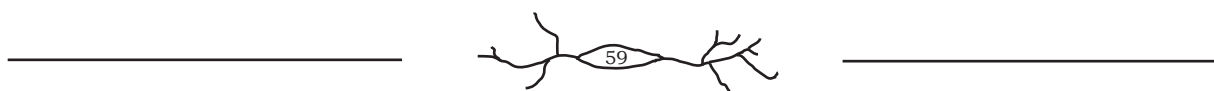
Para la extracción de la médula espinal, en primer lugar, se exponía la columna vertebral mediante la retirada de la caja torácica, la cabeza y las extremidades posteriores. Desde la parte más rostral de la columna y procediendo sobre la parte dorsal, se iba exponiendo la médula

espinal mediante la retirada de hueso con unas pinzas curvas finas, extrayendo también las raíces dorsales y ventrales de la médula espinal.

Una vez extraído el tejido se procedía a su post-fijación mediante la inmersión en el líquido fijador (PFA al 4%) durante 4 horas a temperatura ambiente (*room temperature*, RT, por sus siglas en inglés) en agitación constante. Tras la post-fijación, las médulas espinales se lavaron durante 12 horas en PB en agitación y a 4°C. A continuación, para su crioprotección se sumergieron en soluciones crecientes de sacarosa (Sigma) al 10, 20 y 30 % (peso/volumen) en PB, a 4 °C, el tiempo suficiente en cada concentración para sumergirse completamente. Una vez finalizado el proceso, se dividieron en cuatro zonas: cervical, torácica rostral (T1), torácica caudal (T2) y lumbar, y se retiraron cuidadosamente las meninges con ayuda de dos pinzas curvas. Posteriormente, cada sección se congeló encastrada en OCT® (Tissue-tek, Leica), realizando todo el proceso en hielo seco y conservándose a -80°C hasta su uso. El OCT es un medio sintético que favorece la realización de cortes en criostato a temperaturas de -20°C, para su posterior análisis inmunohistoquímico.

La zona T1 de cada médula espinal fue cortada de manera coronal en un criostato (Leica), realizando cortes seriados de 20 µm de grosor que eran recogidos en portaobjetos Superfrost®Plus. Las secciones fueron almacenadas a -20 °C hasta su utilización.

En el caso del tejido procedente de los



ratones EAE del HRCH de Málaga, la médula espinal fresca extraída tras el sacrificio y la perfusión con PBS 1X se fijó durante 48 horas a RT. Tras su inmersión en sacarosa al 30% (peso/volumen) en PBO, 1M durante 12 horas, se procedió de la misma manera para la conservación y corte del tejido.

6. Tinción de eriocromo cianina

Para el análisis de la desmielinización del SNC, se realizó la tinción de eriocromo cianina (EC), habitualmente utilizada en nuestro grupo (Moliné-Velázquez et al., 2011; Moliné-Velázquez et al., 2014). La eriocromo cianina es una tinción aniónica sintética que forma complejos con cationes como el hierro, y que puede teñir tanto núcleos como mielina, dependiendo del compuesto diferenciador utilizado. En nuestro caso, los cortes histológicos se secaron durante 2 horas a RT y otras 2 horas en una estufa a 37 °C. A continuación, los portaobjetos se sumergieron en acetona fría durante 5 minutos a RT, y se dejaron airear durante 30 minutos para que se evaporase la acetona. Posteriormente, los cortes fueron sumergidos en una solución de tinción que contenía 0,2% de Eriocromo Cianina (Sigma), 0,5% de ácido sulfúrico (H₂SO₄, Sigma) y un 4% de aluminio férrico (Sigma, preparado al 10% en agua destilada), en agua destilada durante 30 minutos a RT. Tras ese tiempo, los cortes se lavaron en abundante agua corriente bajo el grifo para la eliminación del exceso de colorante. Para la diferenciación del tejido teñido, los

cortes se sumergieron en una solución acuosa de aluminio férrico (Sigma) al 5% en agua destilada durante 10 minutos a RT. Tras lavar con agua corriente de la misma forma que anteriormente, los cortes se sumergieron en una solución de bórax-ferrocianuro, durante 10 minutos a RT. Tras lavar abundantemente con agua corriente, se comprobó la correcta diferenciación de la tinción bajo el microscopio de campo claro (zonas mielinizadas teñidas en color azul y zonas desmielinizadas blanquecinas o amarillentas). Para su conservación, y siempre bajo la campana de extracción de gases, las secciones se deshidrataron en una batería de soluciones de etanol (Panreac) de concentración creciente al 70, 80, 90, 96 y 100%, se aclararon en dos baños de xileno (Panreac) al 100 % y se montaron con medio de montaje colocyó un cubreobjetos sobre las secciones. Los portaobjetos así preparados se dejaron secar en la campana y se conservaron a RT.

7. Inmunofluorescencia

Para la detección de antígenos presentes en la secciones, se sacaron las secciones del congelador a -20 °C y se dejaron descongelar y secar a RT durante 1 hora. A continuación, se enjuagaron 3 veces durante 10 minutos cada lavado en PB y se realizó un pretratamiento con metanol al 10 % en PB 0,1 M a RT durante 15 minutos y en agitación. Tras dos lavados de PB 0,1 M y PBS 1X de 10 minutos cada uno, se procedió a la incubación en solución de bloqueo

para evitar las uniones inespecíficas, que contenía un 5% de suero normal de burro (o en inglés NDS, *normal donkey serum*, Millipore) y un 0,02% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) en PBS 1X, durante una hora, en oscuridad, cámara húmeda y a RT. En el caso de los anticuerpos que requerían amplificación de la señal mediante el sistema de avidinas-biotinas o método ABC utilizando el kit comercial Vectastain® (Vector Laboratories), se incubaron durante 15 minutos las secciones a RT en la solución comercial de bloqueo de avidinas primero, y de biotinas después, con tres lavados de 5 minutos de PBS entre una solución y otra. Tras una hora de incubación en la solución de bloqueo, que en este caso se trataba de suero de caballo (Vector Laboratories), NDS las secciones se incubaron en la mezcla de anticuerpos primarios (Tabla 5) en la solución de bloqueo correspondiente durante 12 horas, a 4°C y en cámara húmeda.

Tras sucesivos lavados para eliminar el excedente de la solución de anticuerpos primarios, se realizó el revelado mediante la utilización de anticuerpos secundarios de fluorescencia o conjugados con biotina (para el caso del sistema ABC) en la solución de bloqueo a una concentración de 1:1000 durante una hora a RT. En el caso del sistema ABC, se incubaron las secciones durante 1 hora en la solución de avidinas y biotinas (preparada 30 minutos antes a una concentración de 1:200 en la solución de suero de caballo). Tras sucesivos lavados con PBS,

se incubaron las secciones en tiramida (TSA®, Perkin Elmer, sistema de amplificación de señal) a 1:50 en el diluyente comercial durante 10 minutos. Tras lavados, la secciones se incubaron en estreptavidina conjugada al fluoróforo deseado a una concentración de 1:500 durante 30 minutos a RT. A partir de este punto, las secciones con y sin amplificación se tiñeron con Hoechst (Sigma) para el revelado de núcleos a una concentración de 1:10 respecto al stock (100 µg/ml de Bisbencimida, Sigma-Aldrich, en agua milliQ) en PBS y durante 10 minutos a RT, en oscuridad y en cámara húmeda. Finalmente, las secciones se lavaron en PBS y se montaron con cubreobjetos en medio de montaje Fluoromont® (SouthernBiotech)

8. Detección de apoptosis en tejido mediante técnica de TUNEL

Para el análisis de los linfocitos T CD4⁺ en apoptosis se utilizó la técnica de TUNEL (del inglés, *Terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT)-mediated dUTP-fluorescein Nick End- Labelling*) con el kit comercial ApopTag Plus Fluorescein In Situ Apoptosis (Millipore). Siguiendo las instrucciones del fabricante, las secciones de médula espinal se descongelaron y atemperaron a RT durante 1 hora. Tras tres lavados de 10 minutos en PB en agitación a RT, se

fijaron con PFA al 1% en PB también durante 10 minutos en las mismas condiciones. Se realizaron lavados en PB y PBS 1X y una post-fijación durante 5 minutos en una solución de 1:1 etanol/ácido acético absolutos, previamente atemperada a -20°C. A continuación, tras dos lavados de 5 minutos en PBS 1X se equilibró el tejido en el tampón de equilibrado proporcionado por el kit y se preparó para la incorporación de dUTP-fluoresceína en los extremos 3'-OH del ADN mediante la incubación durante 1 hora a 37 °C en la solución de la enzima TdT al 50% en tampón de reacción (proporcionado por el kit). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se paró la reacción con el tampón de parada y se incubó con anti-digoxigenina al 47% en solución de bloqueo durante 30 minutos a RT. Tras varios lavados con PBS, se realizó una inmunohistoquímica para células CD4⁺ siguiendo los mismos pasos que se han explicado en el apartado anterior. Se consideraban linfocitos T CD4⁺ en apoptosis cuyo los núcleos presentaban condensación de la cromatina y además presentaban marcaje positivo para la técnica de TUNEL.

9.Cultivo y purificación de células precursoras de oligodendrocitos (OPCs)

Para el estudio del efecto de las MDSCs sobre los OPCs, se realizaron cultivos primarios a partir de cortezas de ratones recién nacidos (edad postnatal 0) de la cepa CD1. Para ello, se utilizó uno de los métodos aceptados para la purificación

de OPCs, esto es, la separación por selección magnética o MACS (Dincman et al., 2012).

Una camada completa de ratones P0 (12-16 ratones) se utilizó para cada cultivo primario. En primer lugar, el ratón era decapitado con unas tijeras de disección y la cabeza depositada en HBSS^{+/+} (del inglés Hank's Balanced Salt Solution con Ca²⁺ y Mg²⁺; Gibco). A continuación, se procedía a la disección del cerebro retirando el cráneo con cuidado y extrayéndolo con la ayuda de unas pinzas romas. Los cerebros se mantuvieron en un tubo falcon de 50 ml con HBSS^{+/+} en hielo hasta terminar la disección para ralentizar el metabolismo. La retirada de meninges y plexos coroideos se realizó bajo la lupa de disección colocyos los cerebros uno a uno en una placa de Petri con HBSS^{+/+} y con la ayuda de dos pinzas de microdisección y una aguja, empezando por la parte ventral y continuando por la parte dorsal. Una vez retiradas, se despejaron las cortezas eliminando el resto de tejido cerebral (incluido el hipocampo). Una vez obtenidas las cortezas, se trocearon con la ayuda de una cuchilla en una placa de Petri de vidrio y se traspasaron a un tubo falcon de fondo cónico de 15 mL. Se lavó el tejido dos veces con HBSS^{-/-} con centrifugaciones a 100 g durante 1 minuto y a continuación se resuspendió el tejido en una solución de digestión enzimática previamente atemperada que contenía 1,8 mg/ml de papaina (Worthington), 40 µg/mL de DNasa (Sigma-Aldrich), 2 % de B27 (Gibco) y de 0,5 mM N-acetil-cisteína (NAC: Sigma-Aldrich) a una dilución de en medio Hibernate A sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ (BrainBits, UK). Esta solución se

mantuvo a 37 °C durante 40 minutos en agitación suave, transcurridos los cuales se centrifugó a 200 g durante 5 minutos. El pellet resultante se resuspendió en 4 ml que contenía medio Hibernate^{-/-} con 2% de B27 y 1:2000 de NAC (solución denominada “tampón de trituración”). Tras 5 minutos de espera para el equilibrado del tejido, se procedió a la trituración, que constó de tres fases: primero se hizo pasar el tejido por una pipeta de 5 ml, y luego por dos pipetas pasteur de vidrio previamente pulidas a la llama de un mechero Bundsen. Tras cada trituración, la suspensión celular se filtraba por una maya de 70 µm de tamaño de poro a un tubo falcon de 50 mL. Todo el material que se usara para la trituración estaba previamente recubierto con el tampón de lavado (MWB, *Miltenyi washing buffer*, que contenía PBS 1X, 2mM de piruvato de sodio, 0,5 % de BSA y 2 mM EDTA, ajustado a un pH de 7,3). A la suspensión de célula única obtenida se añadía a continuación 11 mL de Percoll (GE Healthcare) al 90 % en PBS 10 X estéril y se añadía volumen de HBSS^{-/-} hasta obtener

una concentración del 20 %. La suspensión se centrifugó a 800 g durante 20 minutos sin freno para evitar la distorsión del gradiente y facilitar la retirada de los restos celulares y la mielina. Una vez retirados, se contaron las células y se realizó la incubación con el anticuerpo primario ratón-anti-A2B5 (Millipore) a razón de 2 µg de anticuerpo por cada 10⁷ células en MWB con 10 µg/ml de insulina, a 4°C, en oscuridad y agitación durante 25 minutos; y con el anticuerpo secundario IgM anti-ratón conjugado con perlas magnéticas (*anti-mouse IgM microbeads*, Miltenyi) a razón de 20 µl por cada 10⁷ células, durante 15 minutos. En el caso de la separación de células O4⁺ se utilizó el anticuerpo primario obtenido de células de hibridoma a una concentración de 1:5 (DSHB, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa) durante 25 minutos en las mismas condiciones, y la incubación del secundario se realizó de la misma manera que en el caso del A2B5. Transcurridas las incubaciones, y tras lavar el anticuerpo con HBSS^{-/-} se procedió a cargar la columna de separación de tamaño mediano (MS, Miltenyi) en el imán. La columna había sido previamente

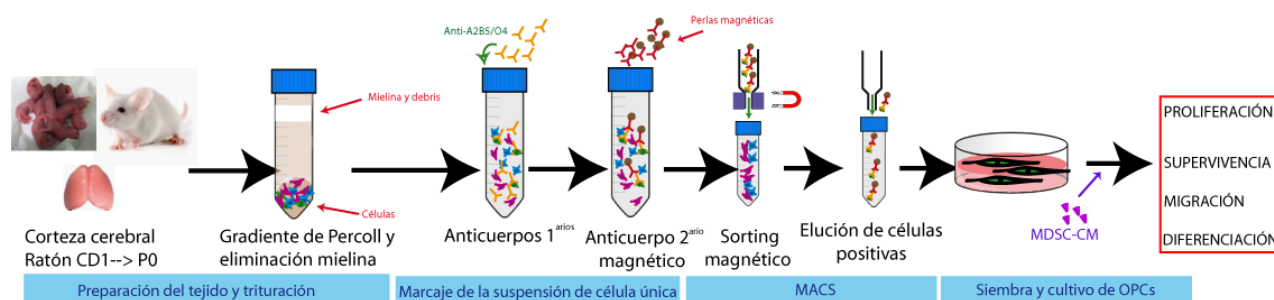


Figura 13 Representación esquemática del protocolo utilizado para el aislamiento de OPCs, mediante la técnica de MACS.

mojada con MWB, y las células resuspendidas en MWB con insulina (10 µg/ml). Tras la adición de las células, la columna se lavó tres veces con 500 µl de MWB con insulina, y se procedió a la elución de la fracción positiva con 500 µL medio de cultivo, que contenía medio DMEM/F12 (Gibco), 60 µg/ml de N-acetil-cisteína, 25 mM de D-glucosa (Normapur), 10 µg/ml de insulina, 1,5 mM de piruvato de sodio, 50 µg/ml de apo-transferrina, 16,1 µg/ml de putrescina, 40 ng/ml de selenito de sodio y 60 ng/ml de progesterona. En el momento de uso, este medio se suplementaba 2% de B27 y N-acetil-cisteína a 1:2000; y para el medio de proliferación se añadía además los factores de crecimiento PDGF-AA y bFGF a una concentración de 10 ng/ml (el cual se denominará “medio de proliferación” en adelante).

Las células A2B5⁺ y O4⁺ obtenidas se contaron y se sembraron según el paradigma que se quisiera estudiar, como se describe en los siguientes epígrafes.

◊ Proliferación

En el caso del estudio de la proliferación, se sembraron células A2B5⁺ a razón de 50.000 células/cm² (15.000 células/pocillo) en una placa de 96 pocillos, previamente tratada con poli-L-Lisina (Sigma, 0,1 mg/ml en tampón borato, pH 8,5) y laminina (Sigma, 10 µg/ml en PBS1X) según el protocolo de nuestro grupo (Medina-Rodríguez et al., 2013), en un volumen de 100 µl de medio de cultivo suplementado con 2% de B27, 1:2000 de NAc y 10 ng/mL de los factores de crecimiento

PDGFAA y FGF2. A las 24 horas de cultivo, se retiró la mitad del medio de cultivo para añadir la misma cantidad del medio condicionado de MDSCs, descongelado y atemperado lentamente, con la correspondiente condición de vehículo (IMDM suplementado). Tras otras 18 horas de cultivo, se realizó el pulso de 50 µM de BrdU (5-bromo-2-desoxiuridina; Sigma-Aldrich), agente intercalante del DNA, durante 6 horas. Una vez retirada la BrdU, se reemplazó el medio por medio fresco (medio de proliferación en la condición control y 1:2 en el caso de la condición “vehículo” y “medio condicionado de MDSCs” y se permitió la proliferación durante otras 24 horas, siguiendo el protocolo de nuestro grupo. Transcurrido ese tiempo, las células se fijaron con PFA al 4% en PB durante 10 minutos y se les realizó la inmunocitoquímica para el marcador de linaje oligodendroglial (Olig2) y anti-BrdU (referirse a la tabla de anticuerpos).

◊ Supervivencia

Para el paradigma de supervivencia de OPCs con medio condicionado de MDSCs, las células A2B5⁺ y O4⁺ obtenidas tras la separación magnética se sembraron en cubreobjetos de vidrio colocados en placas de 24 pocillos a una densidad de 150.000 células/cm² (20.000 células/cubreobjeto) y en el medio de proliferación según lo explicado en el epígrafe anterior. Tras 1 hora de cultivo, se retiró la mitad del medio de cultivo y se añadió el volumen equivalente de medio condicionado de MDSCs o IMDM

suplementado para la condición “vehículo”. Tras 48 horas en cultivo las células se lavaron con PBS 1X atemperado y se fijaron durante 10 minutos con PFA al 4% en PB, para posteriormente realizar la técnica de TUNEL y la inmunocitoquímica para el marcador de linaje oligodendroglial (Olig2).

◊ Migración

Para el estudio de la motogenicidad de las células A2B5⁺ y O4⁺ se utilizaron cámaras de quimiotaxis (cámaras de Boyden, Corning®). Este ensayo se basa en la capacidad de las células sembradas en un compartimento superior de migrar a través de un poro a un compartimento inferior en el que se encuentran factores de quimioatracción. En este trabajo, las cámaras se trataron previamente con poli L-lisina (0,1 mg/ml en tampón borato, pH 8,5) durante al menos una hora a 37 °C y 5 % de CO₂, se enjuagaron dos veces con agua y se trataron con laminina (10 µg/ml en medio DMEM). Las células A2B5⁺ se sembraron en el compartimento superior a una densidad de 120.000 células/cm² en medio de proliferación, con el mismo medio en la parte inferior. Transcurrida una hora, se retiró la mitad del medio del compartimento inferior y se añadió el volumen equivalente de vehículo o sobrenadante de MDSCs. El experimento se mantuvo durante 20 horas, transcurridas las cuales se procedió a la fijación de ambos compartimentos con PFA al 4 % en PB durante 10 minutos, y se procedió a la inmunodetección de A2B5 y Olig2.

◊ Diferenciación

En este caso, las células A2B5⁺ se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 50.000 células/cm² (15.000 células/pocillo) en medio de proliferación. A las 24 horas del comienzo del cultivo se reemplazó la mitad del volumen por medio condicionado de MDSCs o IMDM suplementado para la condición “vehículo”, realizándose el mismo cambio cada dos días. Tras otros 6 días *in vitro* (7 días en total), las células se fijaron con PFA al 4% en PB y se procesaron para detectar por inmunocitoquímica los marcadores de linaje oligodendroglial (Olig2), de oligodendrocitos inmaduros (CNPasa) y maduros (MBP).

10. Inmunocitoquímica

La detección de los diferentes marcadores en los OPCs y oligodendrocitos fijados se realizó mediante inmunocitoquímica, con diferentes anticuerpos (Tabla 5). Para ello, se realizaron tres lavados con PBS 1X de 10 minutos, tanto de la placa de 96 como de 24 pocillos. A continuación, se bloquearon las uniones inespecíficas con una solución de bloqueo que contenía 5 % de NDS y 0,02 % de Triton X 100, en agitación. Tras una hora de bloqueo, se añadió la mezcla de anticuerpos primarios correspondiente en la solución de bloqueo y se incubó durante 18 horas a 4°C, en oscuridad y en una cámara húmeda. En el caso de los cubreobjetos, y para evitar el uso de una cantidad excesiva de anticuerpo,

éstos se colocaron sobre una gota de la mezcla de anticuerpos en parafilm (Bemix), de forma que se cubriese la superficie del cubreobjetos por capilaridad. Tras tres lavados con PBS 1X, se procedió a la incubación con la mezcla de anticuerpos secundarios (siempre a una dilución de 1:1000) nuevamente en la solución de bloqueo, durante 1 hora en oscuridad, a RT y en agitación. A continuación, se realizaron tres lavados, la tinción con Hoechst (para el marcaje nuclear) y otros tres lavados. Los cubreobjetos se montaron con medio de montaje Fluoromont® en un portaobjetos, mientras que las placas de 96 pocillos se mantuvieron en PBS 1X hasta la adquisición de imágenes.

Para el caso de los anticuerpos que no requerían Triton, la técnica se realizó de forma secuencial, procediéndose primero a la incubación con el anticuerpo que no requería detergente, fijando el marcaje con PFA 4% en PB durante 10 minutos y a continuación realizo la segunda incubación con el/los anticuerpo/s que sí requería/n detergente.

La detección por inmunocitoquímica de BrdU tiene un procedimiento especial. En este caso, se realizó en primer lugar la inmunocitoquímica para la detección de Olig2 en las placas de 96 pocillos como se ha descrito, y tras la incubación con el anticuerpo secundario y los correspondientes lavados con PBS 1X, se fijó el marcaje con PFA al 4% en PB durante 10 minutos. A continuación, se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS 1X y se desnaturalizaron

las proteínas celulares con ácido clorhídrico (HCl) 1N durante 1,5 horas, en agitación y a RT. Tras tres lavados con PBS 1X, se realizaron tres lavados con tampón borato (pH 8,5), seguidos de otros tres lavados con PBS 1X. A continuación, se realizó la incubación con una solución de bloqueo que contenía FBS al 5 %, Triton al 0,03%, gelatina al 0,2% y glicina 0,2M en PBS 1X, durante una hora, en agitación y a RT. Este mismo bloqueo se utilizó para realizar la solución que contenía el anticuerpo primario de BrdU (DSHB), con la que se incubaron las células durante al menos 18 horas. Transcurrido ese tiempo, se realizaron tres lavados con Triton al 0,03% en PBS1X, y la incubación con el anticuerpo secundario (en la solución de bloqueo descrita en este párrafo) durante 2 horas, en agitación y RT. A continuación, se procedió como en el resto de inmunocitoquímicas.

11. Cultivos organotípicos de rodajas de cerebelo

Para el estudio de la remielinización ex vivo se utilizaron cultivos organotípicos de rodajas de cerebelo de ratones de 7 días de edad postnatal (P7) de la cepa C57BL6, sin diferenciar el sexo. El protocolo se realizó siguiendo el procedimiento establecido en la literatura (Birgbauer et al., 2004; de la Fuente et al., 2017; di Penta A. et al., 2013; Zhang et al., 2011). En primer lugar, se decapitaron los ratones, se extrajo el cerebro y cerebelo y se separaron mediante el uso de una cuchilla, en HBSS^{+/+} frío. El cerebelo se colocó

en una base de teflón ligeramente rallada para permitir una mejor adhesión del tejido y se cortó con cuchilla de forma automática (utilizando un McIlwain Tissue Chopper). El cerebelo se colocó perpendicular a la cuchilla (Gillete®), de forma que se obtuvieran cortes parasagitales de 350 µm de grosor. Las rodajas así obtenidas se colocaron en medio HBSS^{+/+} (con indicador de pH fenol red; Gibco) y se separaron cuidadosamente bajo la lupa a, con la ayuda de sujeta-agujas y agujas de 25G de calibre. A partir de este momento, el resto de pasos del protocolo se llevaron a cabo bajo condiciones de “esterilidad” en la campana de cultivos celulares. Las rodajas se colocaron sobre insertos MilliCell® de 0,4 µm de tamaño de poro y 30 mm de diámetro (Millipore Merck, Sigma-Aldrich), previamente colocados en pocillos de placas de 6 pocillos con 1 ml de medio de cultivo, humedecidos y atemperados en el incubador a 37 °C y 5 % CO₂ al menos 1 hora antes de su uso. El medio de cultivo que se utilizó durante todo el protocolo contenía HBSS^{+/+}:BME:suero de caballo inactivado (1:2:1, Gibco), 28 mM de D (+)-glucosa (Normapur), 1% de una solución de penicilina/estreptomicina (10.000 U/ml de penicilina y 10 mg/ml de estreptomicina, Sigma) y 0,25 mM de Glutamax (Gibco). La colocación de las rodajas se realizó bajo la lupa, distribuyéndolas por el inserto de forma que no hubiese más de 6 rodajas por inserto, separadas entre sí y de los bordes, y retiró la mayor cantidad de líquido posible para permitir una correcta interfase líquido/aire. El medio se refrescó al

día siguiente y después cada dos días. Tras una semana en cultivo para permitir la recuperación del tejido de la lesión producida por la cuchilla y el cese de la reactividad de la microglía, se indujo la lesión desmielinizante cambiando el medio de cultivo por medio que contenía 0,5 mg/ml de LPC (Sigma), que se mantuvo durante 15 horas. Transcurrido ese tiempo, se retiró el medio que contenía la toxina, se lavaron los insertos con PBS 1X atemperado y se reemplazó por medio de cultivo fresco. Al día siguiente (1 día post-lesión o 1 dpl), se retiró el medio y se sustituyó por uno que contenía al 50 % medio de cultivo de organotípicos y medio condicionado de MDSCs o IMDM suplementado (en el caso de la condición vehículo). Este cambio se realizó cada dos días durante el resto del experimento, hasta la fijación a los 4 y 8 dpl, tras la cual las rodajas se procesaron para inmunohistoquímica como se ha descrito anteriormente, usó en este caso una solución de bloqueo que contenía 5% de NDS y 0,05% de Triton, los anticuerpos MBP y NFH y realizó los lavados con PBS y 0,01 % de triton.

Todos los experimentos se realizaron con el control interno de efectividad de la LPC, fijó insertos con rodajas inmediatamente después de la retirada de la LPC del medio (0 dpl). Todos los experimentos recogidos en esta Tesis Doctoral alcanzaron un mínimo de 20% de desmielinización.

12. Técnicas de imagen y análisis

Para la captura y el análisis de



Uso	Anticuerpo	Diana	Dilución	Especie	Casa comercial
Citometría de flujo	CD11b- PerCP	Células mieloides	0,4 $\mu\text{g}/10^6$ células	Rata	BD Biosciences
	Ly-6C- FITC	M-MDSCs	1 $\mu\text{g}/10^6$ células	Rata	BD Biosciences
	Ly-6G- PE	PMN-MDSCs	1 $\mu\text{g}/10^6$ células	Rata	BD Biosciences
	F4/80-eFluor450	Macrófagos	0,5 $\mu\text{g}/10^6$ células	Rata	eBioscience
	CD11c-APC	Células dendríticas	1 $\mu\text{g}/10^6$ células	Hamster armenio	BD Biosciences
	MHC-II-PE-Cy7	APCs	0,5 $\mu\text{g}/10^6$ células	Rata	eBioscience
	CD3-PB	Linfocitos T	0,5 $\mu\text{g}/10^6$ células	Hamster armenio	BD Biosciences
	CD4-PE	Linfocitos T CD4 ⁺	0,5 $\mu\text{g}/10^6$ células	Rata	BD Biosciences
	CD8-FITC	Linfocitos T CD8 ⁺	1 $\mu\text{g}/10^6$ células	Rata	BD Biosciences
	CD25-PECy5.5	Linfocitos T activados	0,5 $\mu\text{g}/10^6$ células	Rata	eBioscience
	CD69-APC	Linfocitos T activados	1 $\mu\text{g}/10^6$ células	Hamster armenio	eBioscience
	CD11b	Células mieloides	1:10	Rata	AbD, Serotec
	Arginase-I (Arg-I)	MDSCs/ células M2	1:25	Cabra	Santa Cruz
IHQ	Gr-1	MDSCs/ granulocitos	1:10 (TSA 1:100)	Rata	TSA (1:100)
	CD124	MDSCs/ células M2	1:100	Ratón	R&D Systems
	SMI-32	Daño axonal (neurofilamentos fosforilados)	1:200	Ratón	Covance
	CD4	Linfocitos T CD4 ⁺	1:25	Ratón	eBioscience
	MBP	Mielina/oligodendrocitos	1:500	Rata	Serotec
	NFH	Neurofilamentos	1:1000	Conejo	Abcam
	Olig2	Linaje oligodendroglial	1:200	Conejo	Millipore
	BrdU	Células proliferantes	1:20	Ratón	DSHB
	A2B5	Precursores gliales	1:10	Ratón	ATCC Hibridoma
	NG2	OPCs	1:100	Conejo	Millipore
	PDGFR α	OPCs	1:100	Cabra	R&D Systems
	O4	Preoligodendrocitos/ oligodendrocitos inmaduros	1:5	Ratón	Hibridoma Bank
	Sox10	OPCs	1:100	Conejo	Sigma

Tabla 5. Tabla en la que se recogen los anticuerpos utilizados durante este trabajo. Abreviaturas: ICQ= inmunocitoquímica; IHQ= inmunohistoquímica. Para el resto, referirse al texto.

imágenes tanto de tejido como de células se utilizaron distintos equipos y procedimientos.

» Microscopio confocal

En primer lugar, 3 secciones de 20 μm de grosor de médula espinal torácica por animal procesadas para inmunofluorescencia, con una separación entre sección y sección de 160 μm , se analizaron utilizando el microscopio confocal Leica TCS SP5 de escaneo rápido (Leica) del Servicio de Microscopía y Análisis de Imagen del HNP.

Se adquirieron microfotografías de las áreas infiltradas de cada sección a 40X aumentos (realizando mosaicos cuyo fuese necesario), analizando los suficientes planos por foto para abarcar la totalidad del marcaje de los anticuerpos, con una separación entre planos de 1 μm y una resolución de 1024 x 1204 píxeles. El recuento de las células se realizó utilizando el software LAS AF 2.6 (Leica), mientras que para la medida de área infiltrada y área total se utilizó la aplicación Image J (Image J). La misma se utilizó para el análisis semicuantitativo de la intensidad de marcaje de los anticuerpos Gr-1 y CD124, analizando la intensidad media de fluorescencia de los píxeles positivos para el marcaje de membrana de 7-10 células por lesión.

Para la toma de imágenes de los cultivos organotípicos de cerebelo se utilizó el microscopio confocal Leica SP-5 invertido de la Unidad de Imagen Científica y Microscopía del IC. Se realizaron 2 microfotografías a un aumento de 40X por rodaja, seleccionando al menos tres rodajas

por condición de experimentos independientes. Las imágenes se obtuvieron de las zonas de acumulación de fibras nerviosas, con un zoom digital de 1,7, con 0,5 μm de distancia entre planos y de un grosor de alrededor de 10 μm , a una resolución de 1024 x 1024 píxeles. La adquisición de imágenes representativas de los cultivos de diferenciación de OPCs se realizó en el mismo equipo, a un aumento de 40X y una resolución de 1024 x 1024 píxeles.

» Microscopio time-lapse

En el caso del análisis de daño axonal con el marcaje de SMI-32, se analizaron 3 secciones por animal tomandomicrofotografías de toda la sección utilizando el microscopio DMI6000B para células viva-VTL (Leica). Las imágenes se analizaron utilizando una macro (abreviatura de “macroinstrucción”) de Image J, de creación propia por parte del Servicio de Microscopía y Análisis del HNP. De forma breve, consistía en la selección del área deseada (área de lesión vs área total; área de lesión vs área de sustancia blanca), establecimiento del umbral de fluorescencia para el fluoróforo en cuestión y ejecución. Las medidas resultantes aparecían en μm^2 .

En el caso del análisis de los cultivos celulares realizados sobre cubreobjetos de los paradigmas de supervivencia y migración las imágenes se tomaron en el microscopio de fluorescencia Leica AF 6500-7000 (Leica) del IC. Se realizaron 10 microfotografías por cubreobjeto, seleccionadas de forma aleatoria y con duplicados por cada condición, con el objetivo de 20X aumentos. El

recuento celular se realizó de forma manual y utilizando el programa Image J, aplico en todo caso un procesado con reducción del tamaño de la partícula (*erode*), dilatado (*dilate*) y separación de partículas unidas (*watershed*), y aplicando un tamaño mínimo de partícula de 10 μm^2 .

» Microscopio de estereología

Para el análisis de la zona desmielinizada en secciones teñidas con el método de EC, se tomaron microfotografías de la sección entera a 10X aumentos en el microscopio Olympus BX61 para estereología y mapeo anatómico, con cámara DP71 (Olympus) del Servicio de Microscopía y Análisis del HNP, junto con superimágenes en mosaico capturadas usando el programa VisionPharm y se analizaron las áreas utilizando la aplicación ImageJ.

» Analizador celular

Las placas de 96 pocillos utilizadas para el estudio de proliferación y diferenciación se analizaron utilizando el Analizador celular robotizado In Cell 1000 Analyzer (GE Healthcare Life Sciences) del Servicio de Microscopía y Análisis del HNP y el In Cell Analyzer 2200 de la Universidad de Cambridge, respectivamente. Este equipo está especializado en celómica, es decir, medida de células. La celómica comprende la citometría de flujo y la citometría de imagen, Además, consta de dos paquetes de software: captura y análisis.

Para la captura se usa el software In Cell 1000 Analyzer, con el que se estableció un protocolo de captura automática de 50 imágenes

de cada pocillo. Para ello, se utilizó un objetivo de 20x aumentos acoplado al láser encargado de determinar el punto de enfoque. A continuación, se eligieron los pocillos exactos de la placa a los que se le va a aplicar el protocolo. Para adquirir las imágenes, se utilizaron tres filtros: el filtro para núcleos (Hoechst), con una longitud de onda de excitación de 360-40 y emisión de 460-40; un filtro para detectar Alexa488, con una longitud de onda de excitación de 480-40 y emisión de 535-50; y un filtro para detectar Alexa 594 con una longitud de onda de excitación de 565-30 y emisión de 620-60. En segundo lugar, para el análisis se utilizó el software In Cell 1000 Analyzer Workstation, que analiza las imágenes grabadas en formato propio del programa y en 12 bits (4000 tonalidades de gris).

A continuación, se establece el protocolo de análisis. Para el caso de proliferación, se definió un valor de sensibilidad de segmentación para determinar qué es núcleo. De esta forma, se establecía como “máscara 1” la región ocupada por el núcleo y 2 μm más de perímetro alrededor. La “máscara 2” o célula creó un collar alrededor de la máscara uno utilizando las imágenes obtenidas con el segundo filtro (verde). La “máscara 3” o referencia se creó a partir las imágenes obtenidas con el tercer filtro (rojo) tomandocomo referencia de la máscara 1.

El siguiente paso en el análisis consistió en el establecimiento de los umbrales de cada filtro utilizando un árbol de decisión. El primer nivel consistió en la determinación de qué es células.



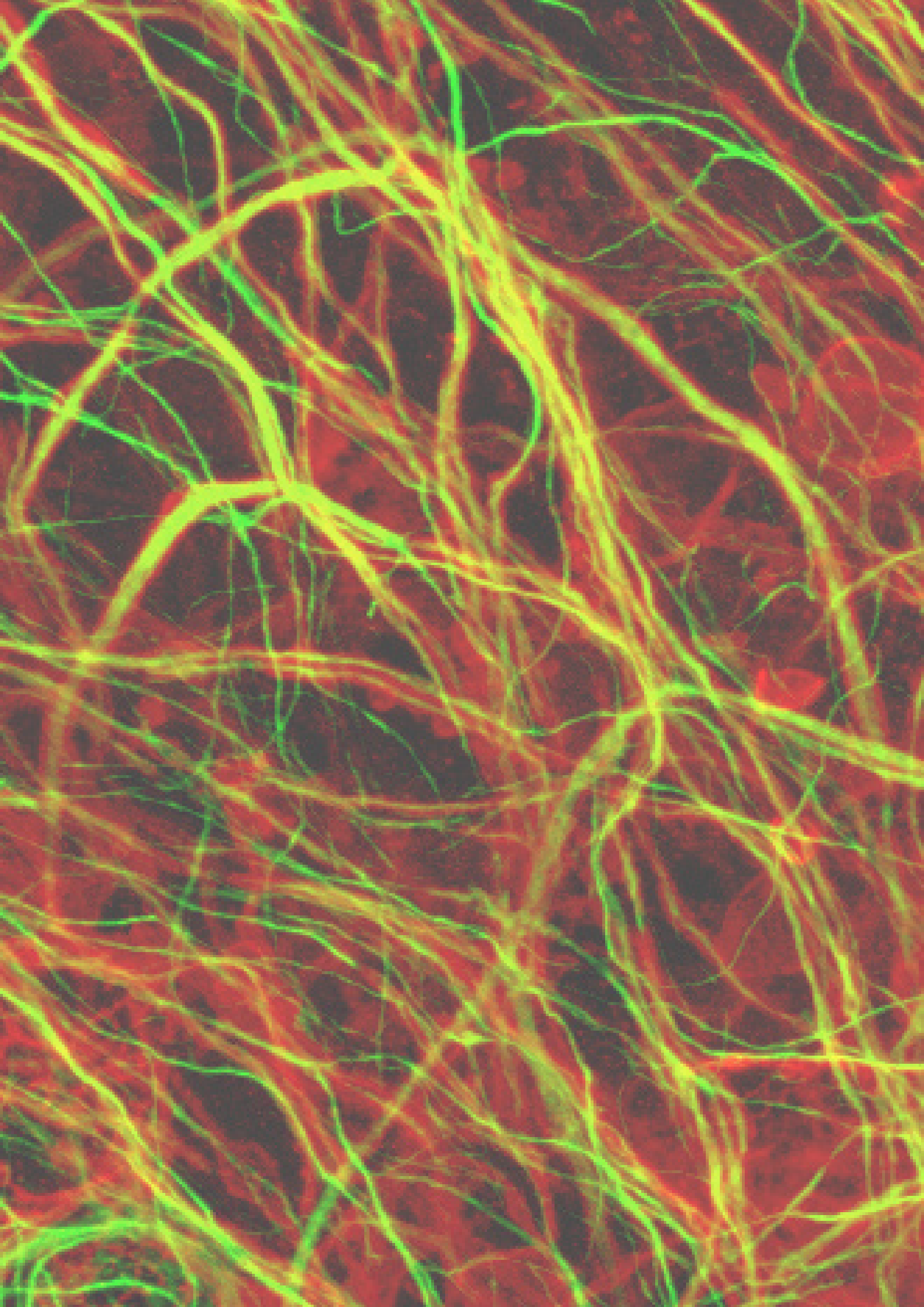
13. Análisis estadístico

Para ello, se estableció un valor de $26 \mu\text{m}^2$ por debajo del cual no se consideraba los elementos detectados con la máscara 1 como núcleos a considerar. Además, se estableció un valor de 2,5 como factor de forma, por encima del cual no se consideraba núcleo. El segundo nivel consistió en la determinación de la intensidad del marcaje en verde (en este caso Olig2), en el que se comparaba el valor de la máscara 2 con el núcleo, y en el que se estableció un valor de 2,610 (base log10) a partir del cual se consideraba marcaje positivo. Además, en este nivel se estableció un valor de 1,855 (base log10) por encima del cual los núcleos se consideraban demasiado grises para pertenecer al linaje oligodendroglial. Por último, en el tercer nivel se determinaba la intensidad del marcaje del rojo (en este caso, BrdU), en el que se estableció un valor de 2,928 de la máscara 3 respecto al núcleo a partir del cual se consideraba positivo el marcaje. Los datos se guardaron en formato Excel (Microsoft Office).

En el caso del análisis de la diferenciación, se estableció un protocolo de captura automática de 50 imágenes de cada pocillo. Para ello, se utilizó un objetivo de 20x. El análisis del área ocupada por los oligodendrocitos diferenciados se realizó haciendo pasar una macro de Image J, cortesía de la Dra. Alerie Guzmán, del laboratorio del Dr. Franklin (Universidad de Cambridge).

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SigmaPlot 11.0® (Systat software, Inc). Los datos se expresan a lo largo de todo el trabajo como la media estadística \pm el error estándar de la media (SEM, *standard error of the mean*). En el caso de dos muestras apareadas o dependientes (observaciones artificialmente emparejadas por el investigador, atendiendo a características como “animales inducidos”, “células en cultivo”, “días post-inmunización”, etc.), se realizó el test de *t* de Student cuyo la distribución era normal y su correspondiente test de rangos (*Ranks*) cuyo no era normal. Para los análisis de más de dos muestras, se utilizó el test ANOVA de una vía y su correspondiente no paramétrico (*ANOVA on Ranks*). En caso de ser significativo el ANOVA, se llevaron a cabo los tests de comparaciones múltiples (*post hoc*) más adecuados. Los estudios de correlación se llevaron a cabo utilizando el test de Pearson para distribuciones normales y el test de Spearman para distribuciones no normales, o cuyo el coeficiente de variación de Pearson (cociente entre la desviación estándar y la media, expresado en porcentaje) fuese superior al 30%.

El nivel mínimo de significación estadística fue de $p < 0,05$, estableciéndose los siguientes grados de significación: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; y *** $p < 0,001$.



The background of the slide is an abstract pattern of thin, glowing green and yellow lines that crisscross diagonally across a dark red, textured field. The lines vary in thickness and brightness, creating a sense of depth and movement.

Resultados

1. LA CAPACIDAD INMUNOSUPRESORA DE LAS MDSCS SE VE POTENCIADA FARMACOLÓGICAMENTE CON IFN- β

Como ocurre con otras células reguladoras, el potencial de la población de células mieloides supresoras reside por una parte en su capacidad para regular la abundancia y actividad de otras poblaciones del sistema inmune, y por otra parte en la importante plasticidad que presentan dependiente del ambiente inflamatorio circundante. Por estas razones, entender la función de estas células durante la patología de EM así como su posible modulación por agentes endógenos y exógenos podría aportar nuevos datos que permitan una mayor comprensión de la fisiopatología y el diseño de mejores estrategias terapéuticas. Aunque cada vez se conoce más los efectos que diferentes tratamientos para EM tienen sobre las diferentes poblaciones inmunorreguladoras, sólo el estudio llevado a cabo por Cantoni y colaboradores describía los efectos de uno de los tratamientos actuales, el acetato de glatirámico (GA), sobre las MDSCs (Cantoni et al., 2017). Siendo el IFN- β un fármaco de primera línea para el tratamiento de esclerosis múltiple, así como una citoquina con función endógena implicada en diversos mecanismos reguladores, se desconocen muchos de los mecanismos de acción a través de los cuales ejerce su función, lo que se refleja en la falta y pérdida de efectividad, y la aparición de efectos secundarios.

En el presente trabajo se quiso investigar cómo afecta el tratamiento a la presencia y actividad de las MDSCs en ratones con el modelo animal

EAE, pudiendo convertirse en un nuevo factor a tener en cuenta para el diseño del tratamiento, a la vez que se incorpore como nuevo factor modulador para el estudio de las MDSCs *in vitro*.

1.1 El IFN- β incrementa la presencia tanto periférica como en el SNC de MDSCs

En este estudio, se realizó una inyección única con IFN- β (10.000 U/ratón, grupo denominado a partir de este momento como “EAE-IFN- β ”, frente al grupo al que se le administró suero salino, denominado “EAE-Veh”) en el momento en el que los animales presentaban una puntuación en la escala de evaluación clínica entre 0,5 y 1,5.

Como se ha descrito previamente, el tratamiento con IFN- β reduce la pendiente de la curva del curso clínico de la EAE (Cheng et al., 2015). El tratamiento redujo la puntuación alcanzada por los animales de forma significativa desde el primer día post-inyección hasta el punto de máxima discapacidad, comparado con los animales tratados con vehículo (Figura 14A).

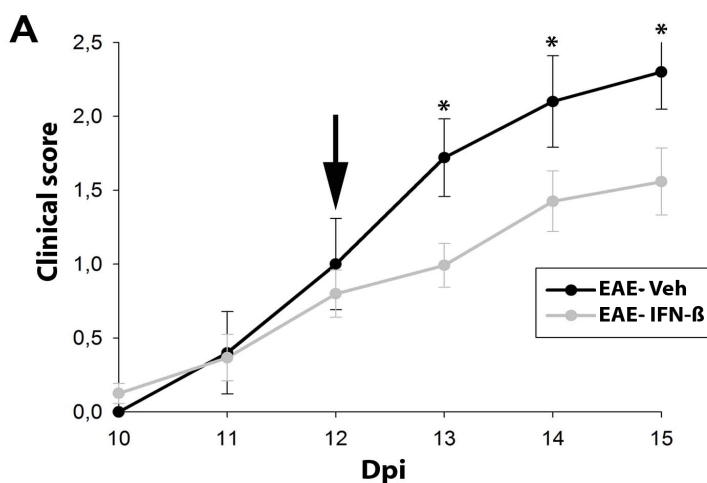


Figura 14. A: El curso clínico de la EAE se ve mejorado con una inyección única de IFN- β en el momento de debut de síntomas. Esta mejora es significativa desde el día siguiente del pinchazo y su efecto perdura hasta tres días después (momento del sacrificio y análisis del tejido). La flecha indica el día del tratamiento con IFN- β (10.000 U/ml).

Para explorar si este efecto podía estar mediado por las MDSCs examinamos el sistema inmune periférico, concretamente el bazo (Figura 15 A-C). El análisis de las diferentes poblaciones celulares por citometría de flujo del tejido esplénico, mostró que el porcentaje de MDSCs (células Ly-6C^{high}Ly-6G^{int/low} con células CD11b⁺ como población parental) se aumentó un $43,93 \pm 14,70$ % respecto a los ratones tratados con vehículo (EAE-vehículo: $6,65 \pm 0,52$, n= 4; EAE-IFN- β : $9,57 \pm 0,98$, n= 7; p = 0,042). De esta forma, aunque el porcentaje que las MDSCs representaba respecto al total de

esplenocitos no se vio aumentado significativamente, sí que se observó un enriquecimiento de esta subpoblación dentro de la población mieloide. Sin embargo, el resto de los tipos celulares mieloides analizados no mostraron diferencias significativas en los ratones a los que se les administró el fármaco: neutrófilos CD11b⁺Ly-6C^{int}Ly-6G^{high} (EAE-vehículo: $61,15 \pm 6,53$; EAE-IFN- β : $61,73 \pm 4,84$; p = 0,870); macrófagos CD11b⁺F4/80⁺ (EAE-vehículo: $6,25 \pm 1,04$; IFN- β $7,73 \pm 4,84$; p = 0,130); células dendríticas CD11b⁺CD11c⁺ (EAE-vehículo: $13,78 \pm 3,08$; EAE-IFN- β : $12,10 \pm 2,23$; p = 0,664). Por el contrario, la proporción de células CD3⁺ (linaje T de linfocitos) respecto al total de esplenocitos se redujo de forma significativa tras el tratamiento (EAE-vehículo: $27,50 \pm 3,05$; EAE-IFN- β : $19,98 \pm 1,51$; p = 0,034; Figura15 B-C).

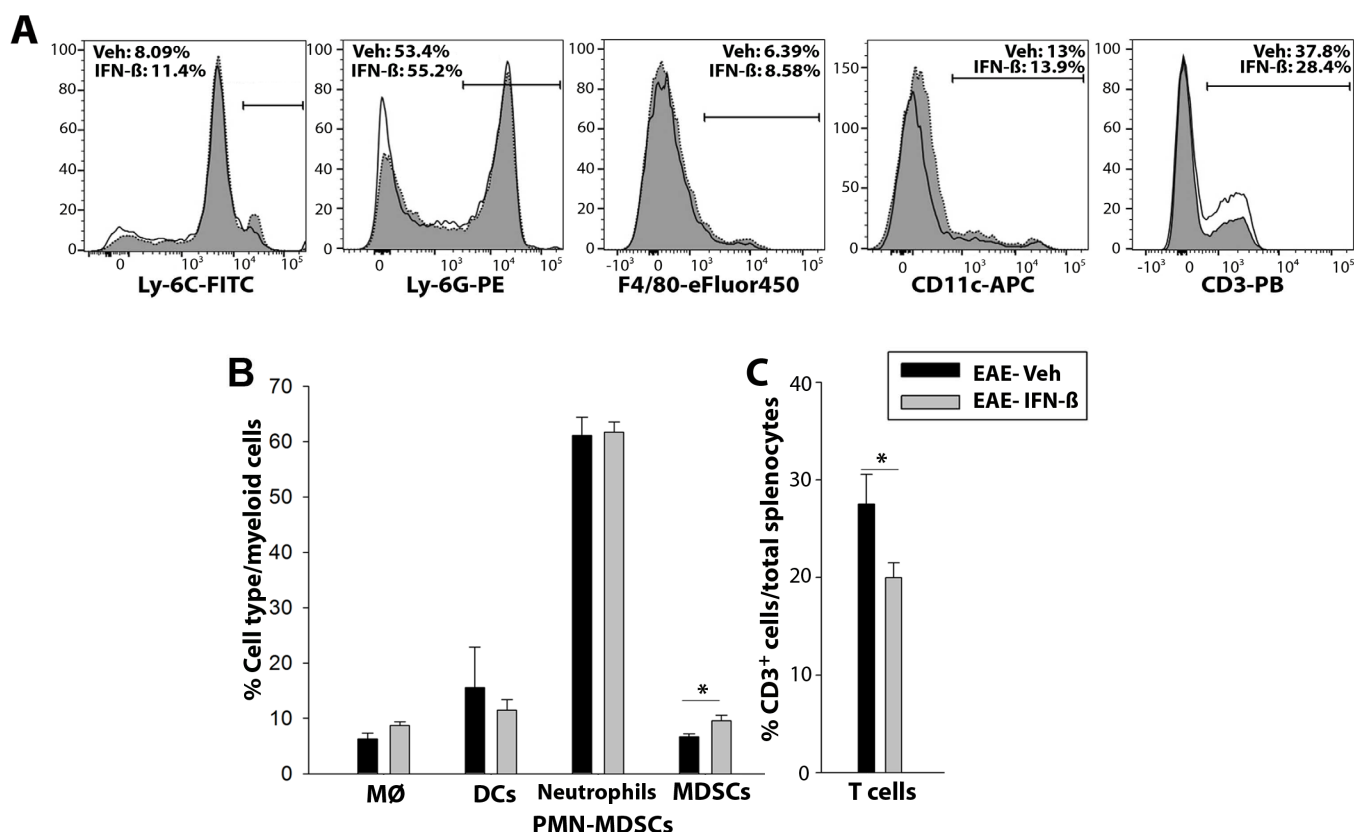


Figura 15. El contenido esplénico de MDSCs aumenta tras el tratamiento con IFN- β . A: Ejemplos representativos de cada uno de las poblaciones esplénicas representadas en B (línea blanca: EAE-Veh; línea gris: EAE-IFN- β). B: Tres días después del tratamiento, el bazo de los ratones EAE-IFN- β presentaba un aumento significativo del porcentaje de MDSCs dentro de la población mielóide, en paralelo a una reducción significativa del porcentaje de células T (CD3+) respecto al total de esplenocitos, comparado con los ratones EAE-Veh. El contenido de las otras subpoblaciones de células mieloides no se vio modificado por el tratamiento.

De hecho, el componente linfóide presentó algunas modificaciones tras el tratamiento con IFN- β , siendo especialmente importante para la

biología de las MDSCs el incremento significativo de la MFI de CD25 en la subpoblación de las células CD4+, así como el porcentaje de células CD4+CD25+ (Figura 16)

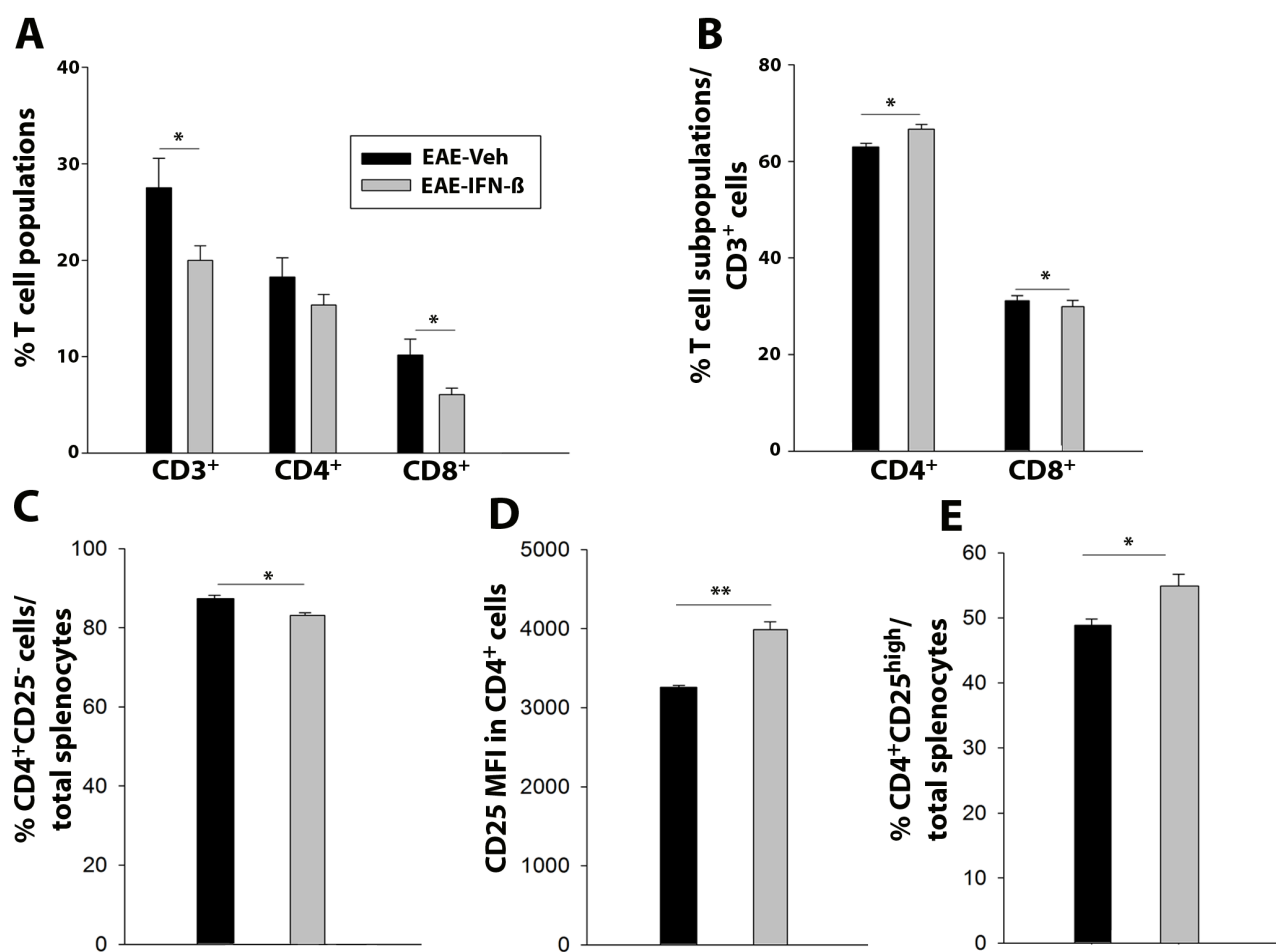


Figura 16 Las subpoblaciones de linfocitos T se ven modificadas tras el tratamiento con IFN- β . A-B: Histograma del porcentaje de linfocitos T y sus subpoblaciones respecto al total de esplenocitos (A) y células CD3+ (B), mostrando una reducción en la población de células T en general y en la subpoblación de CD8+ en particular. C: Representación gráfica del porcentaje disminuido de células CD4+CD25+ respecto al total de esplenocitos en los animales tratados con IFN- β comparado con los animales tratados con vehículo. D: La MFI de CD25 se vio significativamente incrementada en las células CD4+. E: el porcentaje de células CD4+CD25^{high} se vio incrementado tras el tratamiento con IFN- β . Para el análisis estadístico se utilizó el test *t* de Student para muestras pareadas, estableciéndose el nivel de significación como **p* < 0,05; ***p* < 0,01 . El tamaño muestral fue: EAE-Veh= 4; EAE-IFN- β = 7.

Una vez visto que el tratamiento modificaba la proporción de células Ly-6C^{high}Ly-6G^{-/low} (a partir de ahora se abreviarán como células Ly-6C^{high}, o M-MDSCs), se comprobó si efectivamente esta población expresaba el receptor IFNAR1, el más común para los IFNs de tipo I (α/β) (Pogue et al., 2004; Schreiber, 2017). Este receptor estaba presente en la mitad de las células Ly-6C^{high} esplénicas de ratones EAE con una puntuación en

la evaluación clínica entre 0,5 y 1,5 (mismo grado de afectación clínica en el que los ratones reciben el tratamiento *in vivo*, Figura 17 A-B). Este porcentaje es mayor que el global de la población mieloide o que el de la población de neutrófilos; e igual al que presentan las células T. Sin embargo, la intensidad media de fluorescencia es claramente mayor en las células Ly-6C^{high} que en los linfocitos T (Figura 17C).

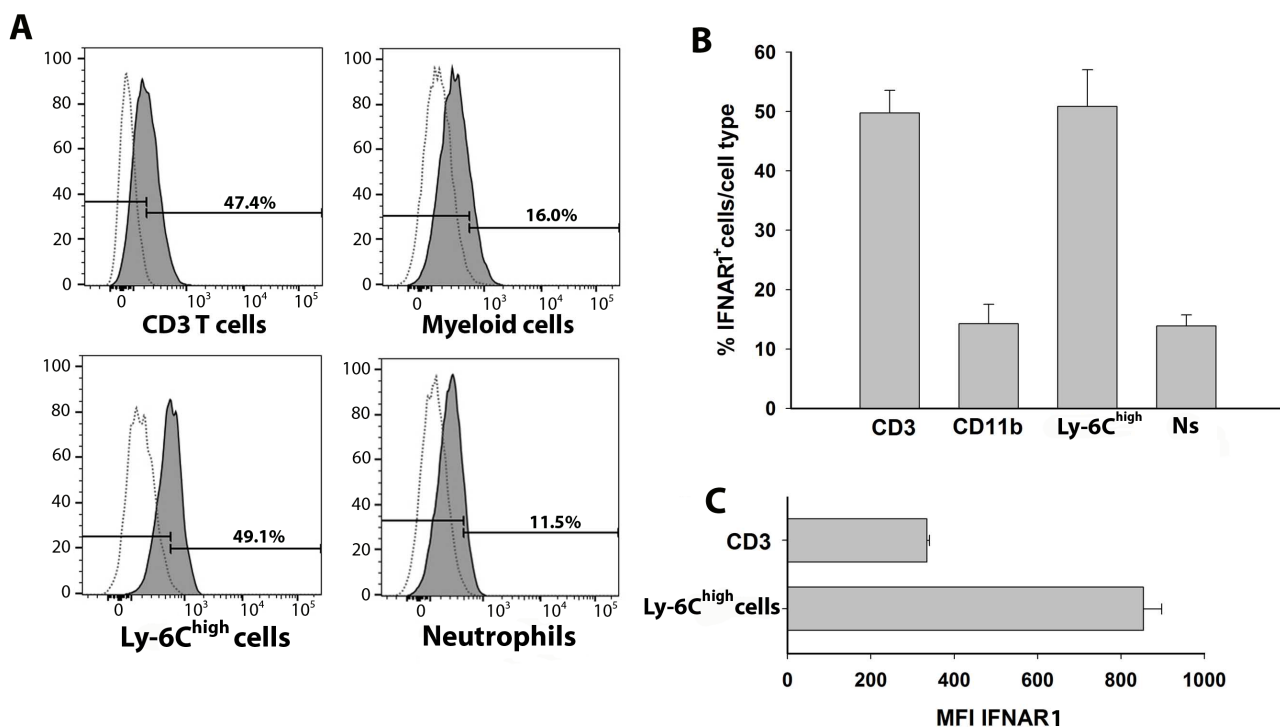


Figura 17. Las células Ly-6C^{high} expresan el receptor para IFN- β . A-B: Gráficos representativos de la expresión de IFNAR1 en las poblaciones celulares del bazo, representadas en B. B: Las células T y las células Ly-6C^{high} son las dos poblaciones con un porcentaje mayor de células que expresan IFNAR1. C: Las células Ly-6C^{high} presentaban un nivel de expresión (MFI) mayor que las células CD3⁺.

Sin embargo, como los síntomas clínicos en este modelo se derivan en su mayor parte de las lesiones inflamatorias y desmielinizantes concurrentes en el SNC, se quiso estudiar la presencia y fenotipo funcional de las MDSCs en la médula espinal (Moliné-Velázquez et al., 2011; Moliné-Velázquez

et al., 2014). Como se puede observar en las vistas panorámicas de la figura 4 (Figura 18A-B), el tamaño del área lesionada en los animales tratados con IFN- β era un 44.10 ± 13.25 % significativamente menor que los tratados con vehículo (EAE-Veh: $13561,60 \pm 2042,71$; EAE-IFN- β : $7581,63 \pm$

1797,14 μm^2 ; $p = 0,017$), y el área infiltrada se restringía a los tractos ventrales, desapareciendo de las áreas dorso-laterales (Figura 18C).

mecanismos de supresión a través de los cuales actúan estas células. Aunque tanto el grupo control como tratado con el fármaco presentaba células Arg-I⁺ en

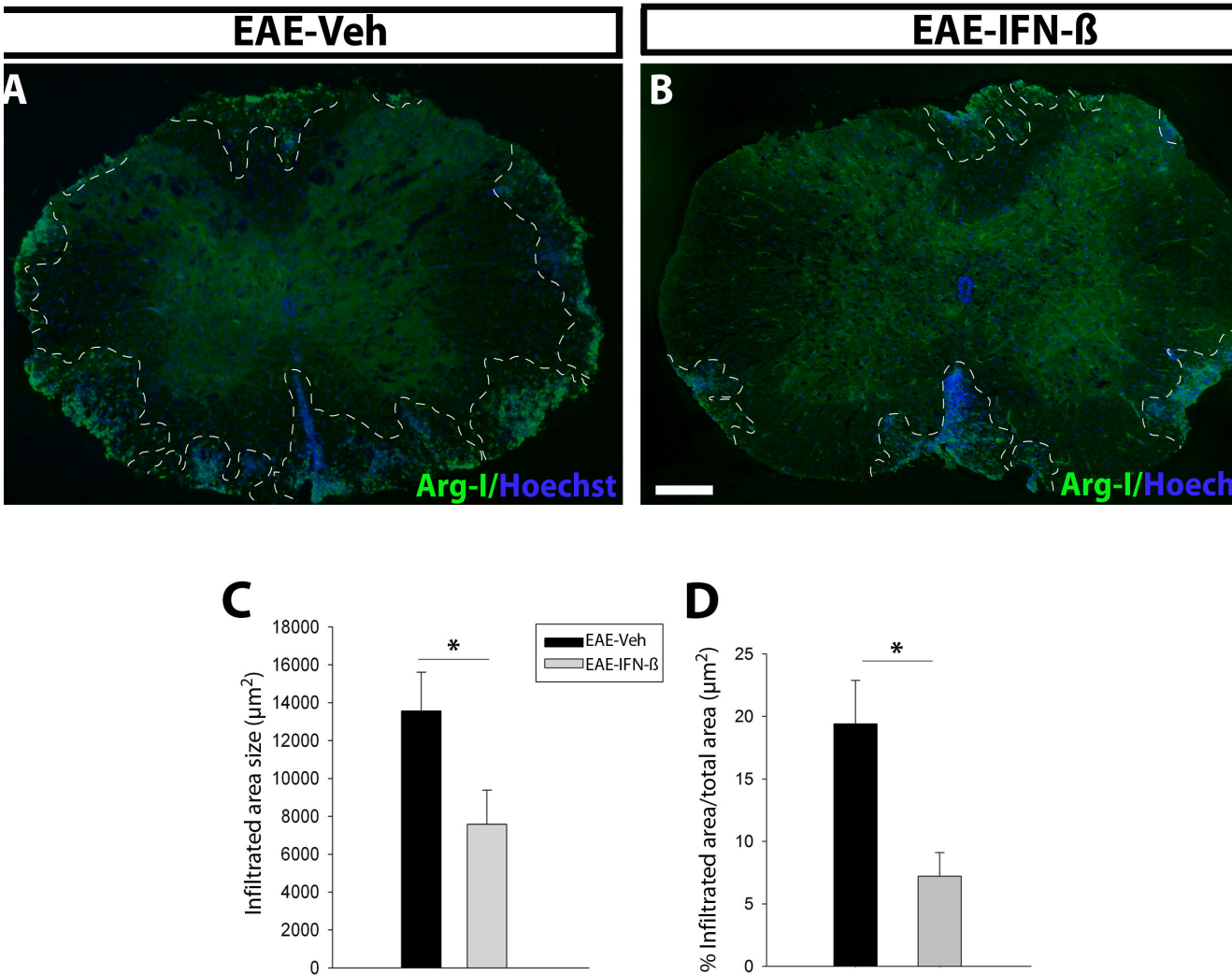


Figura 18. El tratamiento con IFN- β reduce el tamaño de las lesiones del SNC. A-B: Vistas panorámicas representativas de la médula espinal de ratones EAE-Veh (A) o EAE-IFN- β (B) tres días después de la inyección. Las líneas discontinuas delimitan la zona infiltrada. C-E: La inyección única con IFN- β indujo una disminución significativa en el área lesionada (C) y la proporción que ésta representa dentro del conjunto de la sustancia blanca (D). La barra de escala representa 150 μm .

Como se puede ver en trabajos previos (Moliné-Velázquez et al., 2011; Moliné-Velázquez et al., 2014) y se ha descrito previamente en la Introducción, la enzima Arg-I se ha convertido en un buen marcador para MDSCs en la médula espinal del modelo de EAE en ratones en el punto de máxima discapacidad clínica, siendouno de los principales

sus lesiones, su densidad era significativamente mayor después del tratamiento con IFN- β (EAE-Veh: $6720,30 \pm 561,09$; EAE-IFN- β : $15079,72 \pm 883,99$ cells/ mm^2 ; $p < 0.001$) (Figura18A). De hecho, la correlación inversa significativa observada en el grupo control entre tamaño de área infiltrada y densidad de células Arg-I⁺ resultó ser más pronunciada tras el tratamiento con

IFN- β (EAE-Veh: $r = -0,314$, $p = 0,00593$, EAE-IFN- β : $r = -0,642$, $p = 0,0000544$; Figura 19B). Además, como se puede observar en la gráfica de correlación, la mayor parte de las lesiones en los ratones tratados con IFN- β son lesiones pequeñas, siendo así que el percentil 75 es $7693,275 \mu\text{m}^2$; mientras que en el caso de los ratones tratados con vehículo este valor es de $17650 \mu\text{m}^2$. Estos resultados apuntan a un enriquecimiento de células Arg-I $^{+}$ en la lesiones tras el tratamiento asociado a una disminución del área de tejido afectado.

Sin embargo, para saber si las células Arg-I $^{+}$ que se veían afectadas tras el tratamiento con IFN- β se correspondían con el fenotipo descrito para las MDSCs, se profundizó en el estudio de diferentes marcadores fenotípicos y funcionales.

1.2 El tratamiento con IFN- β en ratones EAE induce el enriquecimiento de MDSCs con alta capacidad inmunosupresora en el infiltrado celular mieloide de la médula espinal.

A continuación, siguiendo las recomendaciones de nomenclatura e identificación de MDSCs de Bronte y colaboradores relativa a estudios de tumores (Bronte et al., 2016) y la descripción fenotípica realizada por nuestro grupo en EAE (Moliné-Velázquez et al., 2011; Moliné-Velázquez et al., 2014), se procedió a la caracterización del fenotipo de las células Arg-I $^{+}$ presentes en las lesiones del SNC. Se analizaron varios de los diferentes marcadores específicos presentes en este tipo celular: CD11b, Gr-1 y CD124. CD11b es la proteína de superficie más utilizada para la identificación del linaje mieloide, incluyendo a las MDSCs (Zhu et al., 2007). Entre las células CD11b $^{+}$, se pueden discriminar dos poblaciones: células CD11b $^{+}$ Arg-I $^{-}$ y CD11b $^{+}$ Arg-I $^{+}$, perteneciendo las MDSCs con características inmunosupresoras a las últimas ((Moliné-Velázquez et al., 2011; Moliné-Velázquez et al., 2014). Como ocurre en los ratones tratados con suero salino, todas las células Arg-I $^{+}$ presentaban el marcador mieloide CD11b después de la administración de IFN- β (Figura 20A-F *versus* G-L). Sin embargo, la composición del componente

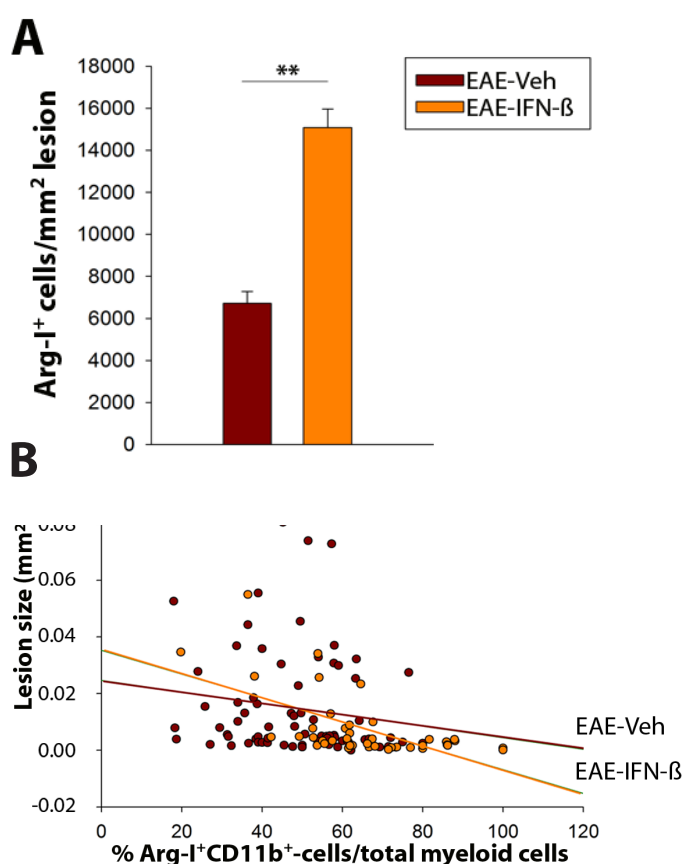


Figura 19. El tratamiento con IFN- β induce un enriquecimiento de células Arg-I $^{+}$ en el área lesionada de la médula espinal. A: La densidad de células Arg-I $^{+}$ en las lesiones es significativamente mayor en los ratones EAE-IFN- β comparado con los ratones EAE-Veh. B: Existe una correlación inversa y muy significativa entre el contenido de células Arg-I $^{+}$ y el tamaño de lesión, siendo esta relación más pronunciada en el grupo de animales tratados. Los círculos rojos representan el grupo EAE-Veh mientras que los amarillos representan el grupo EAE-IFN- β .

mieloide en los ratones tratados con el fármaco era diferente en comparación con los tratados con vehículo. Mientras que en los animales tratados con vehículo la densidad de ambas poblaciones (CD11b⁺Arg-I⁻ y CD11b⁺Arg-I⁺) dentro de la zona infiltrada era similar, en los ratones tratados con IFN- β la densidad de las células doblemente marcadas era alrededor del doble que la de la población de células CD11b⁺Arg-I⁻, y significativamente mayor que la densidad de esta población en los ratones tratados con suero salino (EAE-Veh: 6720,301 μ m² \pm 531,088; EAE-IFN- β : 15079,718 μ m² \pm 883,992; Figura 20P). Atendiendo al porcentaje que las dos subpoblaciones representan dentro del componente mieloide, se aprecia un enriquecimiento de células Arg-I⁺-MDSCs dentro del componente CD11b⁺ de un 32,51 \pm 7,01 %, de forma que se vio reducida la proporción de células CD11b⁺Arg-I⁻ y aumentada la de las células doblemente marcadas en el grupo que recibió el fármaco respecto al que recibió el vehículo. (EAE-Veh: 50,51 \pm 1,94; EAE-IFN- β : 66,93 \pm 3,54; $p < 0,001$; Figura 20Q). Además, dentro del grupo de animales que recibieron el fármaco, el porcentaje de las células Arg-I⁺ estaba muy significativamente incrementado con respecto a la población CD11b⁺Arg-I⁻ (Figura 20Q).

Para profundizar en el estudio de las MDSCs infiltradas en la médula espinal, se analizó el fenotipo de la población de células CD11b⁺Arg-I⁺. Para ello, se estudió el nivel de expresión de dos marcadores de MDSCs, Gr-1 y la cadena alfa del receptor de interleuquina 4 (IL-4R α , también conocido como CD124). En la literatura está ampliamente descrita la co-expresión de Gr-1 y

CD11b en las MDSCs en el bazo (Kusmartsev and Gabrilovich, 2006; Serafini et al., 2006; Zhu et al., 2007). Asimismo, como sucede en el caso del CD11b, todas las células Arg-I⁺ dentro del área infiltrada de la médula espinal presentaban inmunorreactividad a Gr-1 (Figura 21A-F, característica fenotípica ya descrita por nuestro grupo en Moliné-Velázquez et al., 2011; Moliné-Velázquez et al., 2014). Se ha establecido previamente que cuanto menor es la inmunorreactividad presentada por las MDSCs, mayor es la capacidad supresora sobre linfocitos T de este tipo celular (Moliné-Velázquez et al., 2014; Zhu et al., 2007), en estudios tanto in vitro como in vivo. Este estudio reveló un decremento significativo (23,25 % \pm 3,36) en el marcaje de Gr-1 de las células Arg-I⁺ dentro del sistema nervioso central del grupo tratado con fármaco frente al vehículo (EAE-Veh: 34,08 \pm 1,55; EAE-IFN- β : 26,77 \pm 1,09; $p < 0,001$; Figura 21G)

Además, la expresión de CD124 ha demostrado ser un indicativo de alta capacidad de inmunosupresión por parte de las MDSCs en cáncer (Gallina et al., 2006; Kohanbash et al., 2013; Yang et al., 2006) y EAE (Moliné-Velázquez et al., 2014) en el tejido diana. Cuando se analizó el marcaje de CD124 en las células CD11b⁺Arg-I⁺, se encontró que, aunque todas las células Arg-I⁺ presentaban marcaje positivo, éste era un 42,31 \pm 4,72 % mayor en los ratones tratados con el fármaco comparado con los tratados con suero salino (EAE-Veh: 43,09 \pm 1,76; EAE-IFN- β : 61,33 \pm 2,04; $p < 0,001$; Figura 22).

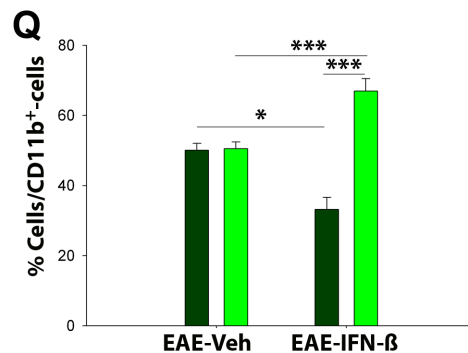
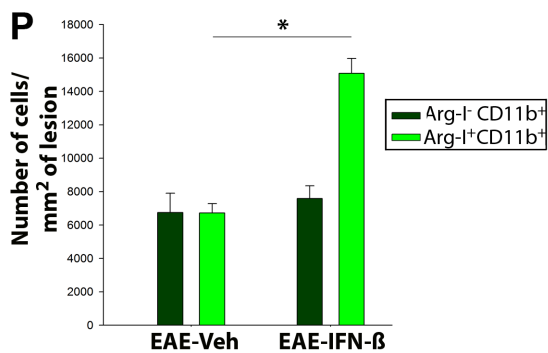
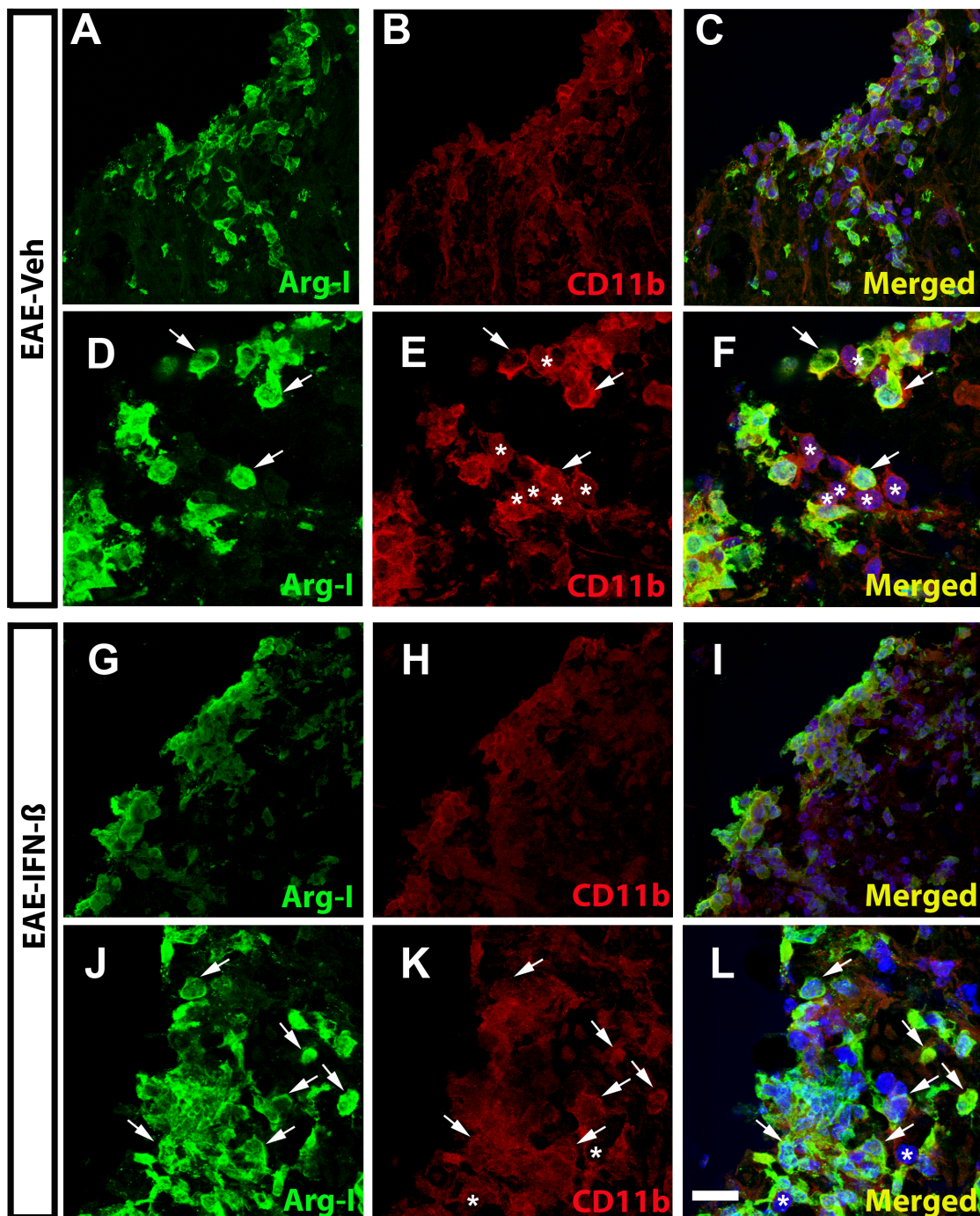


Figura 20. El componente mieloide infiltrado en el SNC se ve enriquecido en MDSCs tras el tratamiento con IFN- β . A-L: Vistas panorámicas representativas (A-C y G-I) e imágenes en detalle (D-F y J-L) de las áreas infiltradas de la médula espinal de ratones EAE-Veh (A-F) o EAE-IFN- β (G-I). Las flechas apuntan a células doblemente marcadas y los asteriscos a células Arg-I/CD11b $^{+}$. P-Q: La población de Arg-I $^{+}$ /CD11b $^{+}$ -MDSCs se ve incrementada tras el tratamiento con IFN- β como se ve por el aumento significativo en la densidad de células doblemente marcadas (P) y el porcentaje que éstas representan dentro del total de la población mieloide CD11b $^{+}$. Las gráficas representan los resultados de tres animales por grupo. La barra de escala representa: A-C; G-I = 25 μ m y D-F; J-L = 10 μ m.

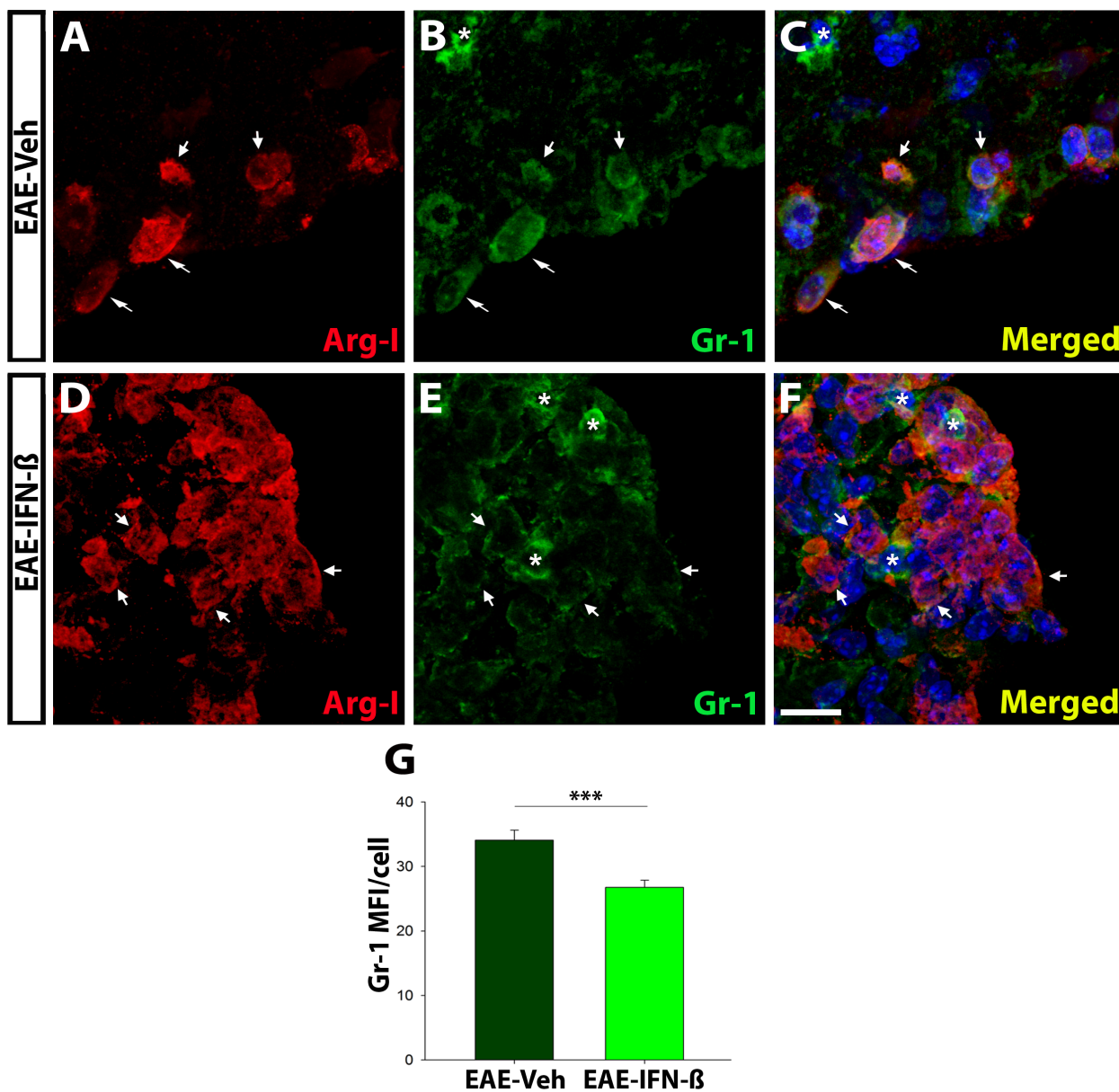


Figura 21. Las MDSCs de ratones EAE-IFN- β muestran un fenotipo inmunosupresor potenciado en la médula espinal. A-G: Aunque todas las células Arg-I $^{+}$ muestran marcaje positivo para Gr-1, éste es significativamente menor en los ratones a los que se les administró IFN- β comparado con los que recibieron vehículo. Las flechas apuntan a células doblemente marcadas, y los asteriscos a células Gr-1 $^{+}$ Arg-I $^{-}$. La barra de escala en A-F representa 25 μ m. Se muestran los resultados obtenidos de tres ratones por grupo (n= 3).

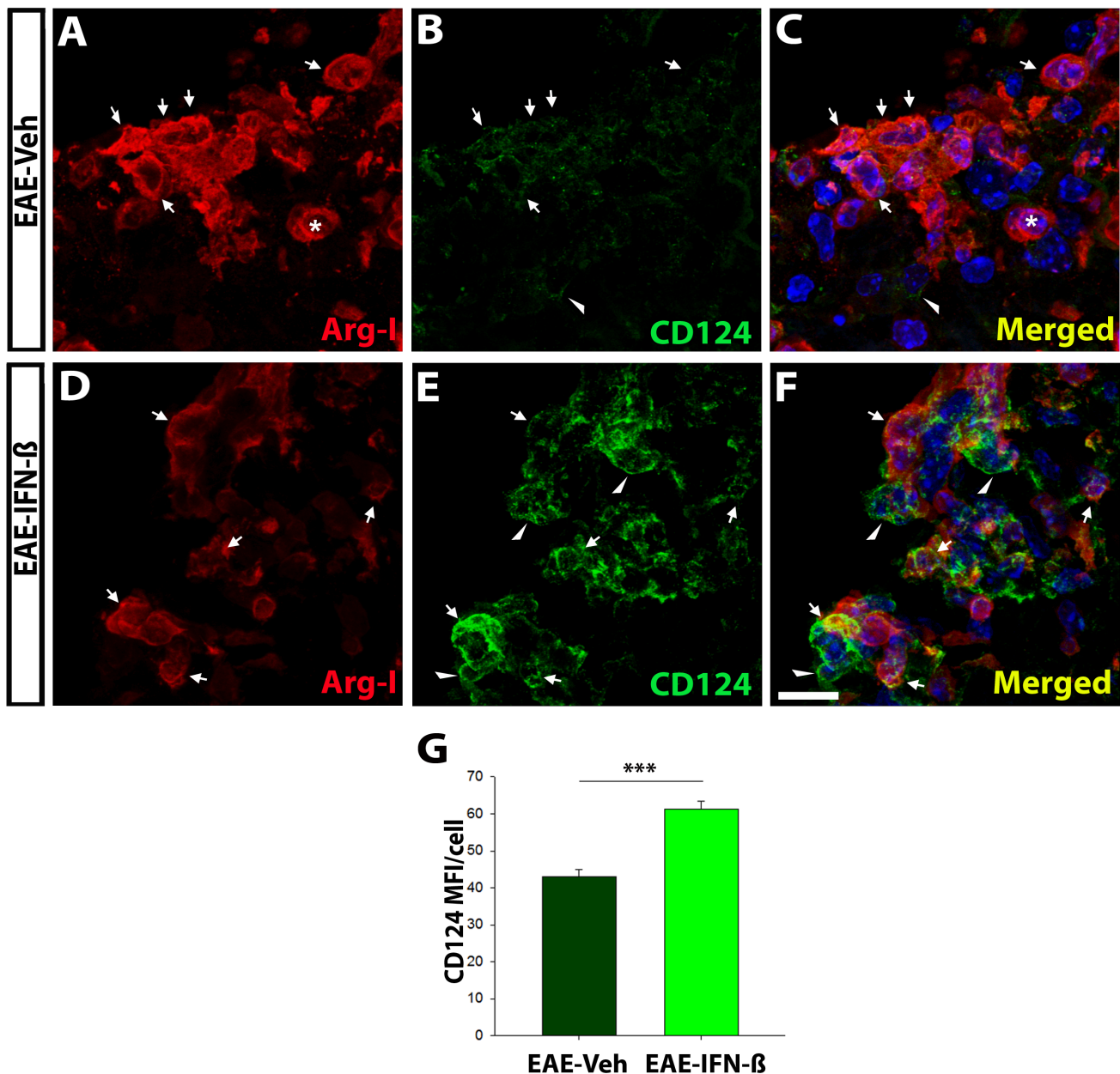


Figura 22. Las MDSCs de ratones EAE-IFN- β muestran un fenotipo inmunosupresor aumentado en la médula espinal. A-F: Vistas panorámicas donde se muestra el marcaje de las lesiones de la médula espinal para Arg-I (en rojo) y CD124 (en verde). G: La intensidad media de fluorescencia de CD124 en las células Arg-I⁺ se ve claramente incrementada tras el tratamiento con IFN- β . Las flechas apuntan a células doblemente marcadas, los asteriscos a células Arg-I⁺CD124⁻ y las puntas de flecha a células Arg-I⁺CD124⁺. La barra de escala en A-F representa 25 μ m. Se muestran los resultados obtenidos de tres ratones por grupo (n= 3).

Para comprobar si el fenotipo inmunosupresor que presentan las MDSCs y que se vio potenciado tras el tratamiento con IFN- β era funcional era necesario comprobar por una parte el nivel de

apoptosis de linfocitos T en el tejido afecto en el modelo animal EAE y por otra lado la efectiva supresión de linfocitos T a través de la promoción de su apoptosis, a lo cual se dedica el siguiente epígrafe.

1. 3 El tratamiento con IFN- β promueve la supresión de linfocitos mediada por MDSCs.

En primer lugar, se quiso estudiar cuál era el nivel de apoptosis de linfocitos T CD4⁺ en la médula espinal tras el tratamiento in vivo con IFN- β . Para ello se analizó la presencia de linfocitos T CD4⁺ que presentaban reactividad a TUNEL y por lo tanto se

encontraban en apoptosis. La adquisición de un fenotipo supresor potenciado tras el tratamiento con el fármaco descrito en el anterior apartado fue acompañada de un incremento de un $308,30 \pm 88,59 \%$ en la densidad de linfocitos T CD4⁺ TUNEL⁺ comparado con los ratones tratados con vehículo (EAE-Veh: $514,01 \pm 79,30$; EAE-IFN- β : $1501,3 \pm 438,72$ cells/mm²; $p < 0,05$; Figura 23).

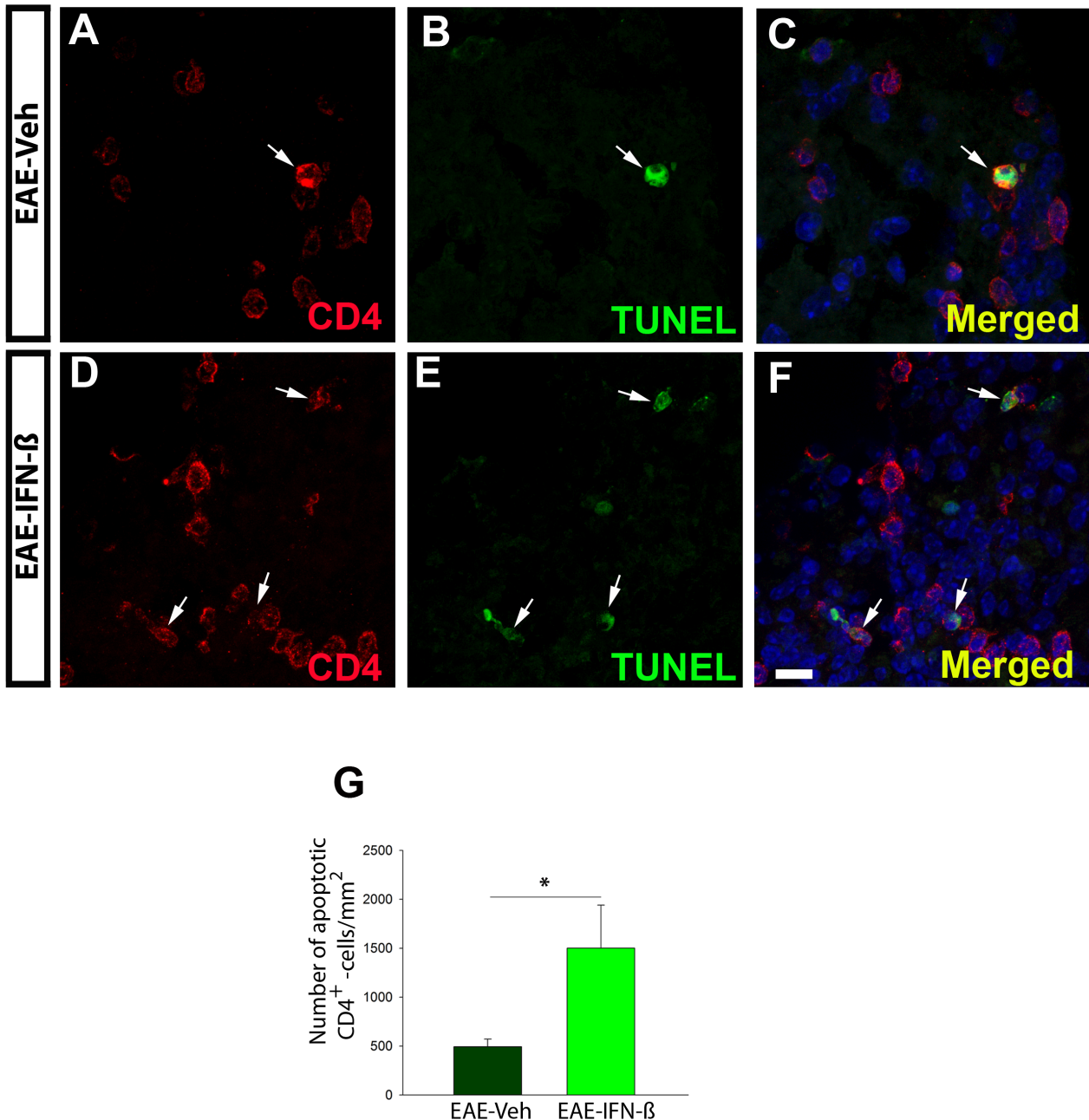


Figura 23. La apoptosis de linfocitos T se ve incrementada tras la administración de IFN- β . A-F: Vistas panorámicas de lesiones de la médula espinal de ratones EAE a los que se administró suero salino (A-C) e IFN- β (D-E), en las que los linfocitos T CD4⁺ aparecen en rojo y las células en apoptosis en verde. Las flechas apuntan a células CD4⁺TUNEL⁺. G: La

densidad de los linfocitos T CD4⁺ en apoptosis, puesta de manifiesto mediante la técnica de TUNEL, era significativamente mayor en el grupo de EAE-IFN- β comparado con el grupo EAE-Veh.. La barra de escala representa 10 μ m

Este último resultado, junto con la descripción de la disminución del marcaje de Gr-1 y el aumento de la intensidad de CD124 en el grupo tratado con el fármaco, apunta al IFN- β administrado *in vivo* como un fármaco potenciador del fenotipo inmunosupresor de las MDSCs.

Sin embargo, es necesario demostrar no sólo el viraje hacia un fenotipo más supresor, sino la promoción de una supresión efectiva y directa sobre los linfocitos T, sus dianas putativas. Para ello, se realizaron ensayos de inmunosupresión *in vitro* desde dos aproximaciones diferentes. Una vez analizado el efecto de la administración *in vivo* de IFN- β tanto en el curso clínico como en el sistema inmune periférico y en el SNC, se quiso averiguar los efectos funcionales de la administración del fármaco en la promoción de la supresión de las células T. Para entender mejor si el IFN- β podría ejercer algún efecto directo sobre la capacidad supresora de las MDSCs, se diseñó un ensayo *in vitro* para la supresión de linfocitos T con MDSCs obtenidas a partir de ratones tratados con vehículo o IFN- β . De esta forma, se aislaba la interacción entre MDSCs y linfocitos T del resto de poblaciones inmunes y del ambiente inflamatorio circundante, evitando la interferencia de los posibles efectos beneficiosos del IFN- β derivados del apagado general de la respuesta inflamatoria tanto en la periferia como en el tejido diana. Como ya se planteó en el punto 1.1, a ratones EAE que presentasen una puntuación en la escala de evaluación clínica de entre 0,5

y 1,5 se les administró una única dosis bien de vehículo de IFN- β y los bazo se recolectaron tres días después del tratamiento. Posteriormente, se aislaron las MDSCs esplénicas siguiendo la misma estrategia de selección por citometría de flujo ya descrita en el apartado “Material y Métodos”. Las MDSCs aisladas de ratones que habían recibido vehículo (MDSC-Veh) o IFN- β (MDSC-IFN- β) se sembraron para su co-cultivo con linfocitos TCD3⁺ (extraídos de ratones control y previamente pre-activados de forma policlonal o no con un tapizado de anti-CD3e/anti-CD28 durante 24 horas) en una proporción 1:4 (MDSC:linfocitos) durante 48 horas (Fig 19 A). El análisis del ciclo celular se realizó utilizando la tinción con ioduro de propidio, agrupando las fases del ciclo celular en tres: células muertas, células en apoptosis (subG1) y células viables en ciclo (comprendiendo los estadios G0-G1, S y G2-M). Este análisis reveló que las MDSC-IFN- β inducían un incremento significativo de 1,4 \pm 0,36 y 1,44 \pm 0,49 veces en el porcentaje de linfocitos T muertos o apoptóticos, respectivamente, junto con una reducción de en la proporción de linfocitos T viables en comparación con las MDSC-Veh (Figura 24B-B’). Es importante resaltar que no se encontraron cambios en la viabilidad de los linfocitos sin estimular expuestos al co-cultivo con MDSCs-IFN- β respecto a las MDSCs-Veh, lo que descarta una inmunosupresión generalizada e indiscriminada. La conclusión que se puede obtener de estos datos es que las MDSCs de ratones tratados

con IFN- β no sólo son más numerosas sino que además presentan una mayor actividad inmunosupresora sobre los linfocitos T activados (Figura 24 B-E).

durante 18 horas con vehículo (MDSCs-Veh) o IFN- β (MDSCs-IFN- β) y se co-cultivaron a una proporción 1:4 (MDSCs:linfocitos T) con linfocitos T

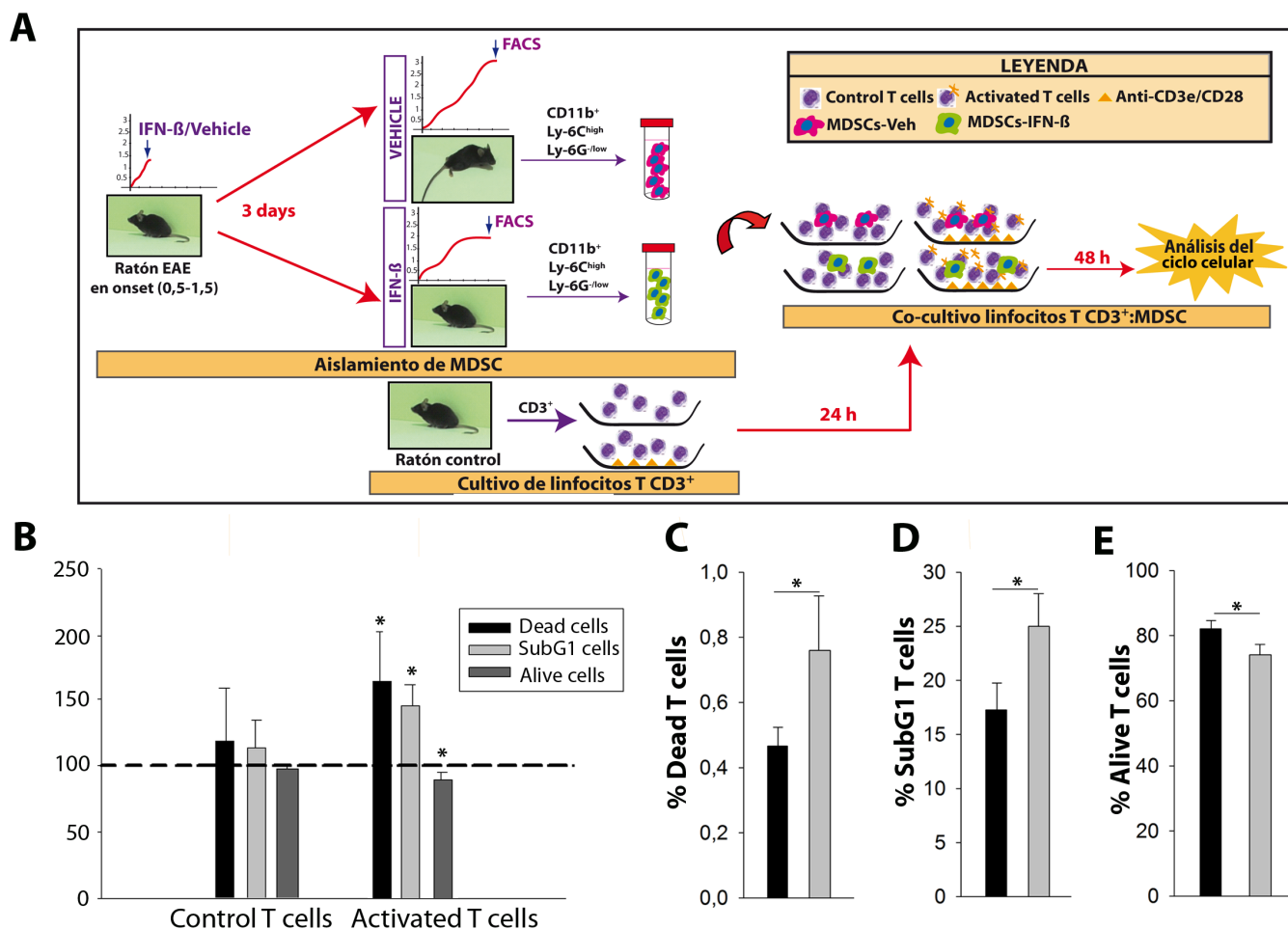


Figura 24. El IFN- β promueve la capacidad supresora de las MDSCs sobre los linfocitos T en cultivo A: Representación esquemática del procedimiento experimental cuantificado en B-E. B: Cuantificación del porcentaje de linfocitos T control y activados en contacto con MDSC-IFN- β en los distintos estadios del ciclo celular, representados como ratio de incremento respecto a los linfocitos T en contacto con MDSC-Veh (línea discontinua, representando el 100 %). Se puede ver un incremento en los linfocitos muertos y en apoptosis y una disminución de las células viables sólo en el caso de linfocitos activados. C-E: Representación de los porcentajes absolutos de los linfocitos T activados en contacto con MDSCs de ratones tratados o no, en los tres estados del ciclo celular: células muertas (C), en apoptosis (D) y viables (E). Los datos se obtuvieron de tres experimentos independientes y se analizaron con el test ANOVA de una vía.

Para saber si esta modulación de su actividad podría ser inducida también in vitro, y para demostrar si el efecto del fármaco era directo sobre las MDSCs, se realizó el segundo abordaje experimental. Para ello, se pre-trataron MDSCs obtenidas de ratones EAE sin tratar en el punto máximo de discapacidad

extraídos de ratones control y cultivados durante 14 horas sin estimularlo con un tapizado de anti-CD3e/CD28 para su activación (Figura 25A). Los resultados del análisis de ciclo celular mostraron que el porcentaje de linfocitos T activados muertos o en apoptosis era significativamente mayor en

contacto con las MDSCs-IFN- β en comparación con aquellos cultivados con las MDSCs-Veh, viéndose también reducido de forma significativa el porcentaje de linfocitos T viables (Figura 28 B-B'). De forma destacable, y al igual que ocurría en el primer abordaje experimental anteriormente mostrado, estas diferencias sólo se observaron sobre los linfocitos T activados pero no en los cultivados sin estimulación, demostrando que no se trataba de un efecto indiscriminado que pudiese provocar una inmunosupresión generalizada.

Con el objetivo de comprobar cuál era el alcance del tratamiento con IFN- β sobre las MDSCs, se realizó el mismo experimento pero con una menor proporción de MDSCs (1:10). En este caso, se demostró que los cambios observados en el ciclo celular de los linfocitos T presentaban una tendencia hacia las mismas diferencias (Figura 25 C-C'). En conjunto, los datos presentados en este estudio demuestran que el IFN- β ejerce un efecto directo sobre la capacidad inmunosupresora de las MDSCs.

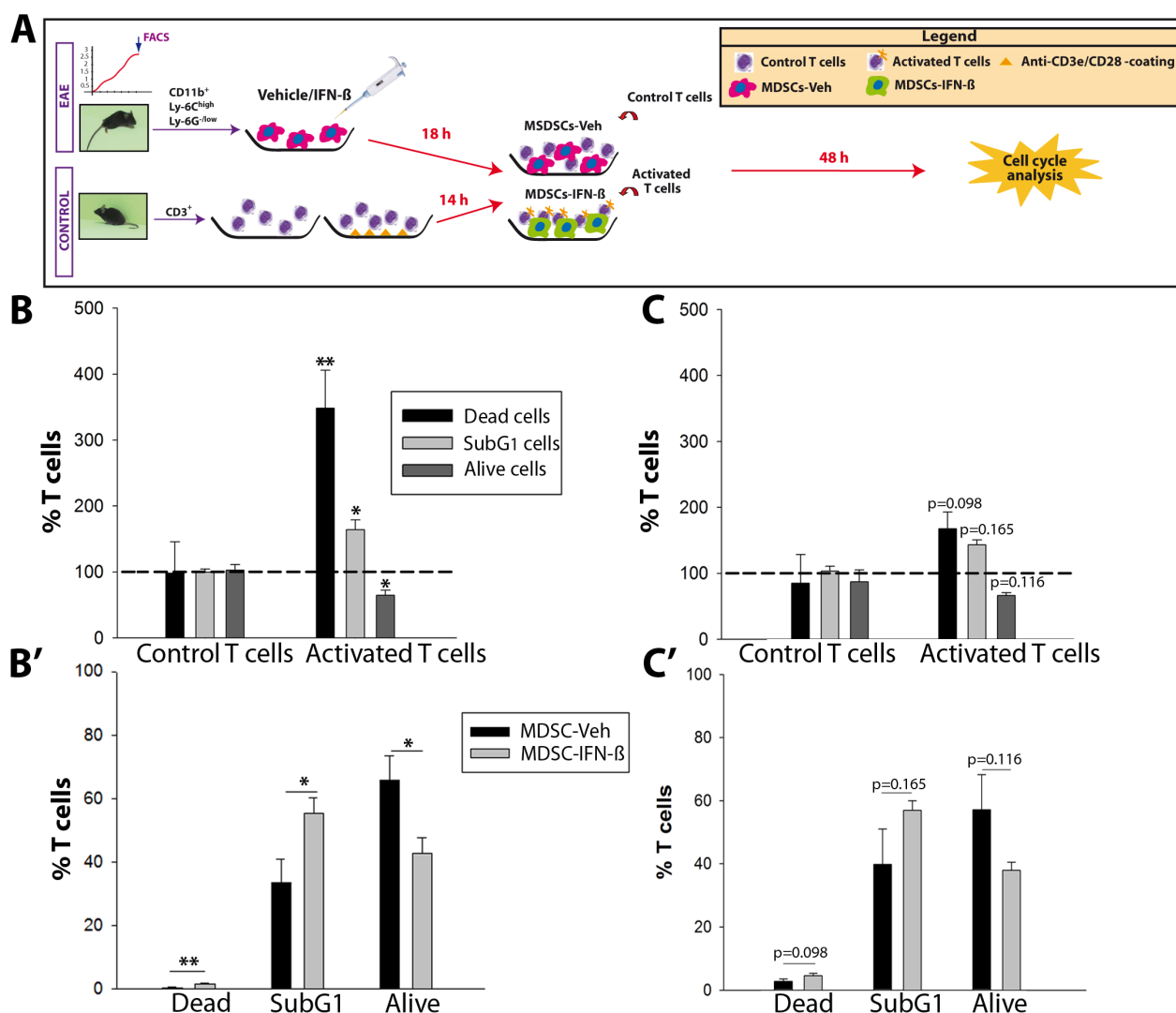


Figura 25. El tratamiento con IFN- β potencia directamente la capacidad supresora de las MDSCs en co-cultivo con linfocitos T pre-activados. A: Esquema del procedimiento experimental. B-C': Las MDSC-IFN- β aumentan significativamente el porcentaje de linfocitos T activados muertos o en fase de apoptosis comparado con las MDSC-Veh y disminuye el de linfocitos T viables, cuyo se co-cultivan a una proporción de 1:4 (B; B'), existiendo una

tendencia en la misma dirección en el caso del cultivo a una proporción 1:10 (C; C'). Las gráficas reflejan los porcentajes relativos (B; C) y absolutos (B'; C'). Los datos se obtuvieron de tres experimentos independientes y se analizaron con el test ANOVA de una vía.

1. 4 El IFN-β mejora la actividad supresora de las MDSCs mediante el mantenimiento de su estado indiferenciado

Con el objetivo de encontrar una explicación sobre el mecanismo por el que el IFN-β potencia la actividad supresora en las MDSCs, y dado que la ésta está altamente determinada por su grado de madurez, se llevó a cabo un análisis a lo largo del tiempo de cultivo del principal marcador de M-MDSCs (Ly-6C) y un marcador de madurez de la subpoblación M-MDSCs (el marcador de macrófagos F4/80). En primer lugar, se quiso comprobar la intensidad media de fluorescencia) de Ly-6C durante el pre-tratamiento con IFN-β. En este sentido, las MDSCs tratadas con el vehículo perdieron parcialmente la MFI de Ly-6C después de 6 horas *in vitro*, siendo este descenso no significativo en el grupo cultivado en presencia de IFN-β (Figura 26A). Sin embargo, tras 18 horas *in vitro* la MFI de Ly-6C se recuperó en las MDSCs-IFN- β llegando a un valor similar al mostrado por las células recién aisladas por FACS, y significativamente mayor que el de las MDSCs-IFN-β a las 6 horas y que las MDSCs-Veh al final del pre-tratamiento. Además de esto, el nivel de expresión del marcador F4/80 aumentó ligeramente y de la misma manera en los dos grupos experimentales a las 6 horas. Sin embargo, este aumento se disparó significativamente a las 18 horas en las MDSCs tratadas con vehículo, mientras que las tratadas con el fármaco permanecieron con una baja expresión de este marcador. Aunque el aumento de las MFI de

las MDSCs-IFN-β a las 18 horas es significativamente mayor que a las 6 horas, seguía siendo muy significativamente menor que el alcanzado por las MDSCs-Veh (Figura 26B). Todos estos resultados apuntan al IFN-β como un potente controlador del fenotipo inmunosupresor de las MDSCs.

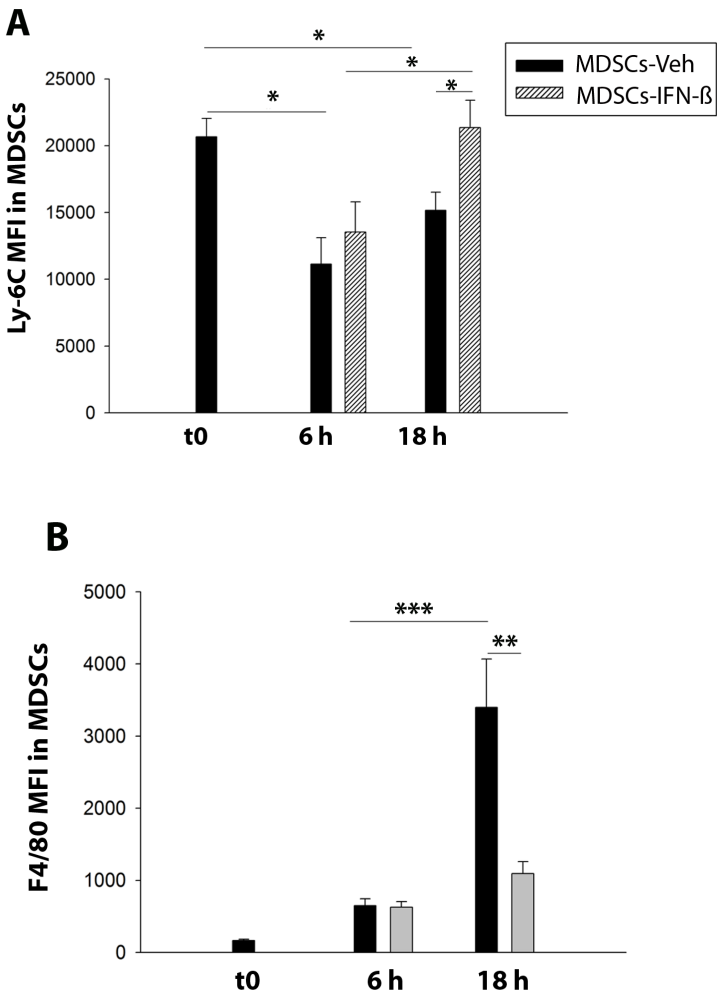


Figura 26. El IFN-β mantiene la capacidad inmunosupresora de las MDSCs mediante la prevención de su maduración. A-B: Análisis del cultivo a lo largo del tiempo de la MFI de Ly-6C (A) y F4/80 (B) como medida de la identidad y nivel de madurez, respectivamente, de MDSCs cultivadas con IFN-β (MDSC-IFN-β) y suero salino (MDSC-Veh) durante 18 horas. El tratamiento con IFN-β preservó la expresión de Ly-6C a los mismos niveles que las MDSCs recién aisladas (A). Además, el cultivo con el fármaco previno la diferenciación de las

MDSCs a lo largo del cultivo puesto que el nivel de expresión de F4/80 disminuyó significativamente en presencia del pre-tratamiento con IFN- β (B).

Con el objetivo de comprobar si el fármaco en estudio producía un efecto permanente y directo en la preservación del estado indiferenciado de las MDSCs bajo las diferentes condiciones de co-cultivo diseñadas, se analizó el fenotipo de las MDSCs (Ly-6C y F4/80) cuyo se cultivaban solas o junto a linfocitos T sin estimular o policlonalmente activados, y se comparó con el fenotipo observado al final del pretratamiento con IFN- β o vehículo (18 horas). La sola presencia de las células T activadas estimuló un incremento de la MFI de Ly-6C en las MDSCs pre-tratadas con vehículo (Figura 27A; ANOVA de los grupos vehículo: $p < 0,01$). Por el contrario, el pre-tratamiento con IFN- β predispuso a las MDSCs a presentar una significativamente mayor MFI de Ly-6C después de todas las condiciones de cultivo (ANOVA de los grupos de MDSCs-IFN- β : $p < 0,05$; Figura 27A). En el caso del F4/80, la alta MFI observada 18 horas después del cultivo con MDSCs tratadas con vehículo no mostró variaciones significativas entre las condiciones experimentales (ANOVA de los grupos de MDSCs-Veh: $p = 0,204$). Por el contrario, la retirada de IFN- β del medio de cultivo produjo un aumento significativo en la MFI de F4/80 (ANOVA de los grupos de IFN- β : $p < 0,001$) cuyo las MDSCs se cultivaron solas o en presencia de linfocitos T sin estimular, pero similar a las 18 horas cuyo se cultivaron junto a linfocitos T activados (Figura 27B). La comparación de la MFI de Ly-6C entre las MDSCs pre-tratadas con vehículo o IFN- β mostró que las MDSCs-IFN- β presentaban unos niveles más elevados de fluorescencia que las primeras,

independientemente de la presencia o ausencia de la citoquina (Figura 27C). En el caso del F4/80, la MFI fue solo inferior al final del pre-tratamiento, es decir a las 18 horas *in vitro*, siendo similar en el resto de condiciones, esto es, cuyo el IFN- β se eliminaba del medio de cultivo (Figura 27D). En conjunto, estos datos indican que el IFN- β previene la diferenciación de MDSCs cuyo es añadido al medio de cultivo, siendo este efecto permanente en el caso de la expresión de Ly-6C pero totalmente dependiente de su presencia en el caso del F4/80.

Los resultados obtenidos en esta primera parte de la tesis doctoral apuntan al IFN- β como fármaco modulador de la presencia y actividad de las MDSCs tanto en el sistema inmune periférico como en el sistema nervioso central. La disminución del tamaño de las lesiones observadas en ratones EAE a los que se les administró el fármaco se vio acompañada de un enriquecimiento de MDSCs dentro del componente celular infiltrado. Además, esta población presentaba un fenotipo inmunosupresor potenciado, lo que se demostró también con dos tipos de ensayos *in vitro*. De la misma manera, el incremento de apoptosis de linfocitos T en el componente celular infiltrado de la médula espinal observado tras el tratamiento con IFN- β y que no se puede asociar de forma causal con la mayor presencia y actividad de MDSCs se confirmó *in vitro* de forma directa mediante el co-cultivo con MDSCs desde dos aproximaciones experimentales: por una parte, con MDSCs provenientes de ratones tratados con el fármaco; y por otra parte, con MDSCs pre-tratadas *in vitro*.

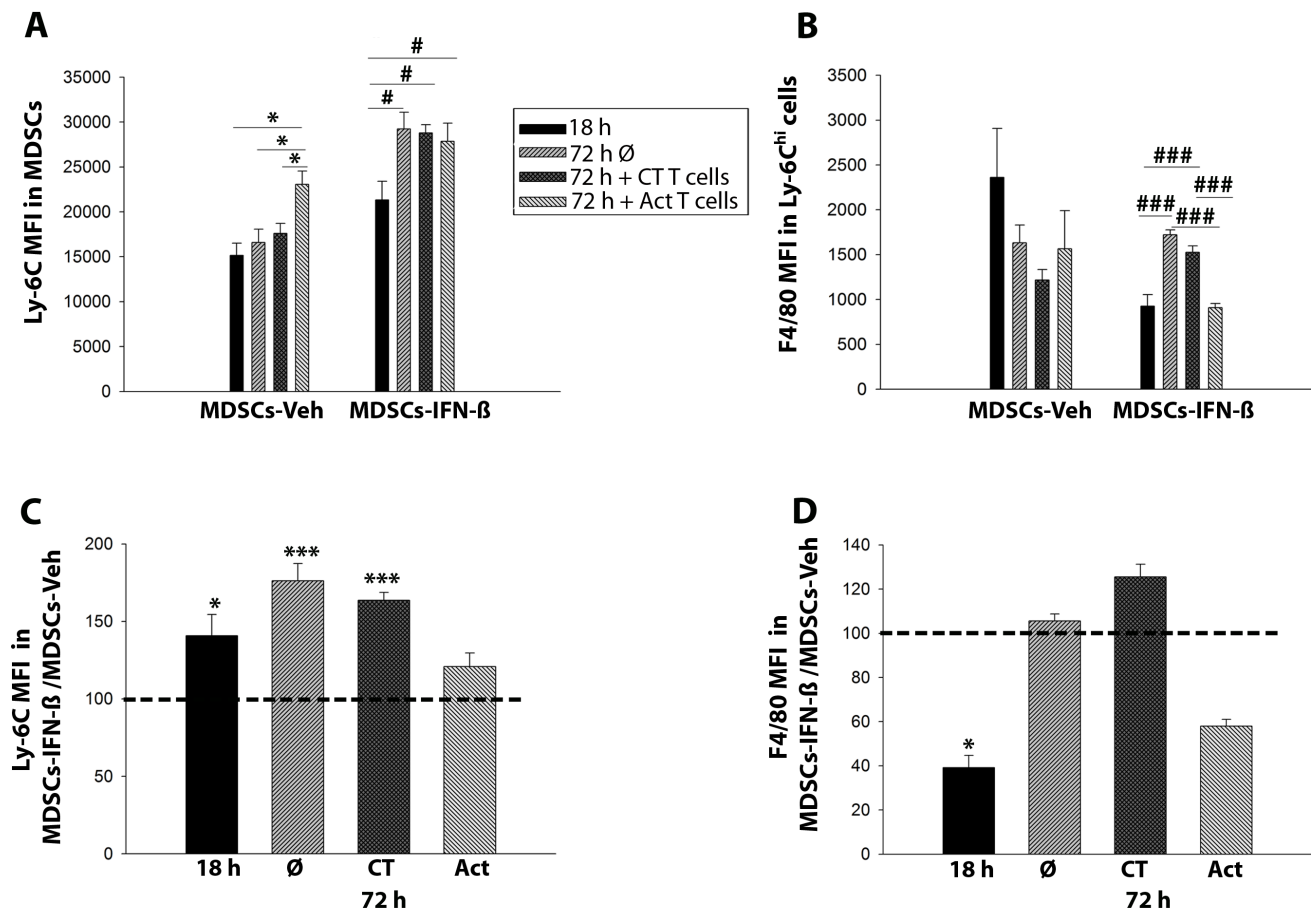


Figura 27. El pretratamiento *in vitro* de MDSCs con IFN- β promueve el mantenimiento de su estado de inmadurez. A-B: Histogramas mostrando la MFI de Ly-6C y F4/80 de las MDSC-Veh y MDSC-IFN- β tras 48 horas en co-cultivo con linfocitos T control o activados, en números absolutos (A y B) o en ratios de incremento respecto a MDSC-Veh (C y D). La MFI de Ly-6C de las MDSC-Veh se vio sólo incrementada en presencia de linfocitos T activados. Por el contrario, el pretratamiento con IFN- β durante 18 horas indujo un aumento significativo en la MFI de Ly-6C cuyo las MDSCs se cultivaron solas o en contacto con linfocitos T control/activados (A). La MFI de F4/80 no experimentó cambios entre condiciones tras el pretratamiento en el grupo vehículo. Sin embargo, la pre-exposición a IFN- β indujo una mayor MFI de F4/80 en todas las condiciones (B). C: Las MDSC-IFN- β muestran una mayor MFI de Ly-6C al final del pretratamiento, 48 horas después, o en presencia de linfocitos T control, pero similar a la alcanzada en presencia de linfocitos T activados. D: La disminución significativa de la MFI de F4/80 observada al final del pretratamiento con IFN- β no se detectó en el resto de condiciones de cultivo.

2. RELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE CÉLULAS MIELOIDES SUPRESORAS Y LA SEVERIDAD DE LA EAE

Como está ampliamente descrito en la literatura, y se ha demostrado en la primera parte del apartado anterior, el curso clínico de la EAE se puede ver modificado tras el tratamiento con diversos fármacos. En esta tesis doctoral se demuestra que la mejora en la evolución clínica producida tras la administración de IFN- β está asociada con una modulación tanto en la presencia periférica y central de MDSCs, como en su fenotipo y capacidad inmunosupresora. La relevancia de las MDSCs en la evolución del curso clínico de la EAE está aún por explorar, pero la capacidad reguladora intrínseca de estas células, su modulación farmacológica con resultado clínico y las variaciones de abundancia relacionadas con los distintos estadios del curso de la enfermedad apuntan a un posible papel en la determinación de la evolución clínica. En este segundo punto de la

parte de “Resultados” se profundiza en la relación de la presencia de MDSCs con diversos aspectos de la EAE tanto clínicos como histopatológicos.

2.1. Clasificación de la evolución clínica de la EAE y descripción de datos clínicos.

El desarrollo del modelo de EAE en ratón, realizo el procedimiento estándar establecido y descrito en el apartado de “Material y métodos”, entraña una cierta variabilidad en la evolución del curso clínico de la enfermedad. Se observaron animales con un rápido progreso de los síntomas que además alcanzaban un grado de máxima discapacidad (que denominaremos “pico”, en adelante) elevado en pocos días, mientras que en otros la fase creciente era menos acentuada y el pico menor.

A

Parámetro clínico	Rango	Media	SEM	Mediana	IQR
Score máximo	1,5 - 3,5	2,769	0,104	3,00	2,5 - 3
Pérdida de peso (g)	- 1,6 - 6,5	2,570	0,370	2,700	1,55 - 3,60
Duración de la enfermedad (días)	3 - 7	4,95	0,246	5	4 - 6
Score acumulado	5,5 - 14	10,281	0,501	10,000	8,5 - 12,125
AI	0,3 - 1,17	0,60	0,0462	0,55	0,44 - 0,75

B

$$AI = \frac{\text{Score máximo}^*}{\text{Duración de la enfermedad}^{**}}$$

Tabla 6. Parámetros clínicos recogidos durante el seguimiento de la EAE. A: Tabla con la descripción estadística de los datos clínicos. B: Fórmula utilizada para el cálculo del índice de agresividad. Abreviaturas: SEM= error estándar de la media; IQR= rango intercuartílico; AI= índice de agresividad. El tamaño muestral es de 20 ratones. *Puntuación máxima alcanzada en la escala de evaluación clínica; **días transcurridos entre el debut de síntomas (0,5-1,5 en la escala) hasta el segundo día consecutivo con el score máximo.

Además, se observaron ratones que alcanzaban el mismo pico en un número distinto de días. Se siguió el curso clínico de 20 ratones a los que se tomaron los siguientes parámetros clínicos (recogidos en la tabla 6): puntuación (denominado “score” en adelante) máxima, score acumulado, duración de la enfermedad (tomando el debut de síntomas como punto inicial y el segundo día con repetición de score máximo como punto final) y peso. Además, se estableció un parámetro denominado “Índice de Agresividad” (AI, aggressiveness index, por sus siglas en inglés) y similar al MSSS de uso común en clínica, definido como el cociente entre la máxima puntuación alcanzada en la escala de evaluación clínica (ver apartado de “Material y Métodos”), considerado como tal el score máximo mantenido durante dos días consecutivos dividido por el número de días transcurrido hasta alcanzarlo (duración de la enfermedad).

La recogida de datos dio lugar a observación empírica de una alta variabilidad en la evolución del curso clínico de la EAE, existiendo ratones con un bajo y alto índice de agresividad, patrón similar al que ocurre en los pacientes de esclerosis múltiple.

Para intentar descifrar el mecanismo subyacente se procedió al análisis de las poblaciones esplénicas del conjunto de ratones analizados: células dendríticas, macrófagos, células presentadoras de antígeno (de las cuales no se muestran los datos por no considerarse relevantes para la pregunta biológica de esta parte de la tesis doctoral) y MDSCs en el componente mieloide; y linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en el componente linfoide. Se observó que la abundancia de MDSCs esplénicas presentaba una variabilidad acorde a la variabilidad encontrada en la evolución del curso clínico, como se puede observar en los ejemplos representativos de la figura 23 (Figura 28A-D).

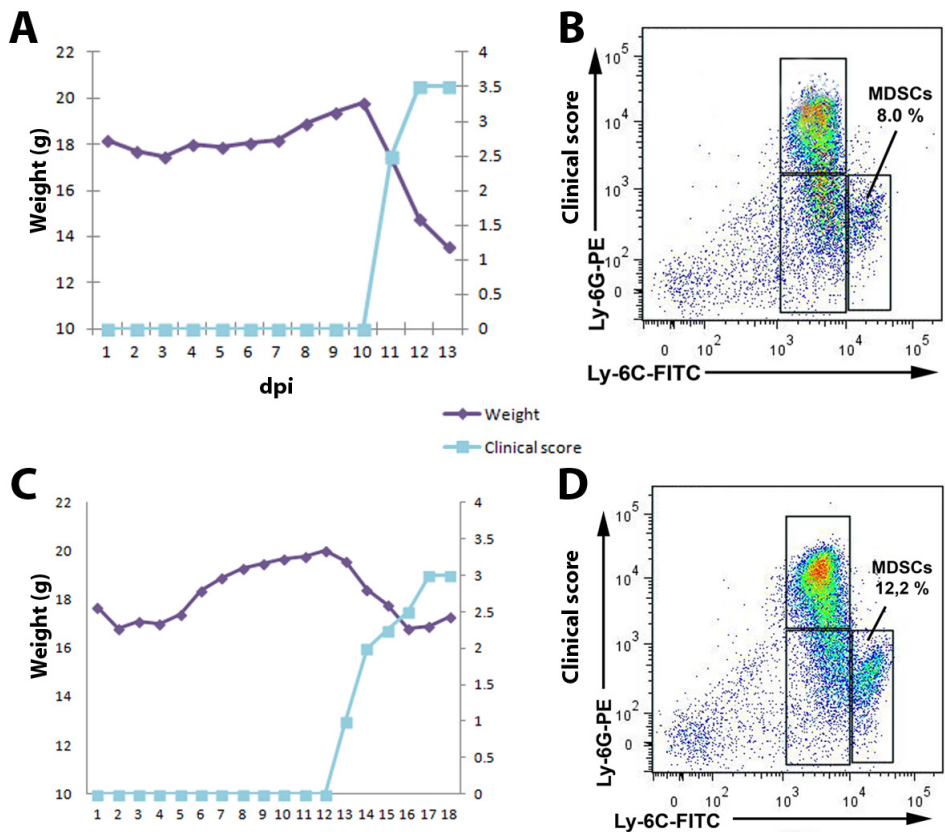
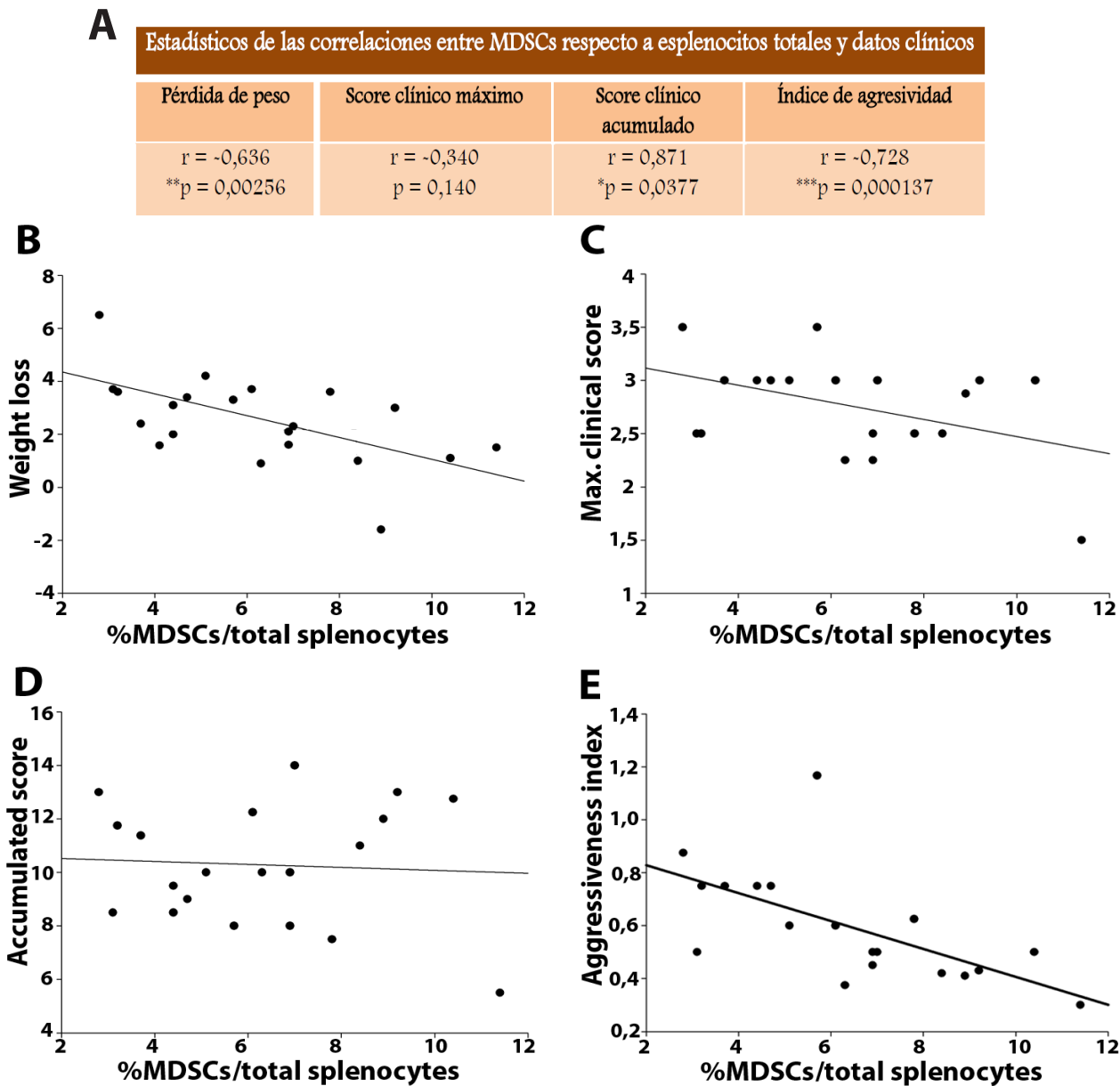


Figura 28. La población de MDSCs es menos abundante en ratones con un curso clínico severo. A-D: Ejemplos representativos del curso clínico (A, C) de un ratón con un índice de agresividad alto (AI = 0,875; A, B) y bajo (AI = 0,5; C, D), y de sus respectivos dot plots de la población esplénica de MDSCs respecto a células mieloides (B, D).

2.2 Relación de la riqueza esplénica de MDSCs con los datos clínicos y las poblaciones linfoides del bazo

Con el objetivo de determinar la relación del sistema inmune periférico con la diferente evolución clínica de la enfermedad, los datos de los porcentajes de las poblaciones anteriormente descritas se cruzaron con los datos clínicos. De entre los datos analizados, se encontró que el porcentaje

de MDSCs tanto respecto al total de esplenocitos como al componente mieloide presentaba una correlación inversa significativa tanto con la pérdida de peso ($r = -0,636$, $p < 0,01$; $r = -0,623$, $p < 0,01$, respectivamente), como con el índice de agresividad ($r = -0,728$, $p < 0,001$, $r = -0,769$, $p < 0,001$, respectivamente), siendo este último dato extremadamente significativo; mientras que no se encontró correlación con el score máximo en ninguno de los casos ni con el score acumulado en el caso del análisis de MDSCs dentro del componente mieloide (Figura 29).



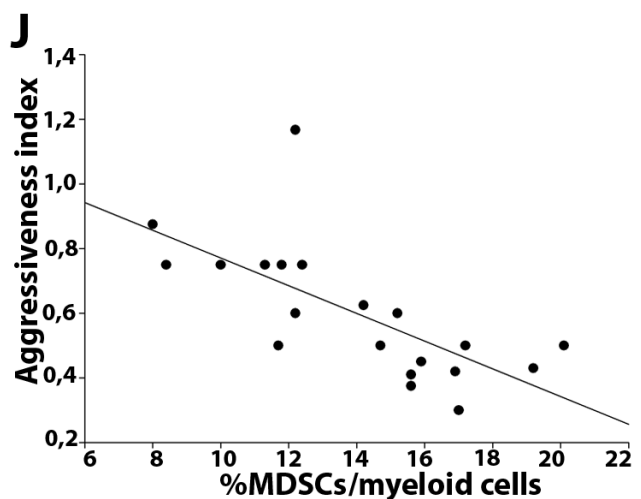
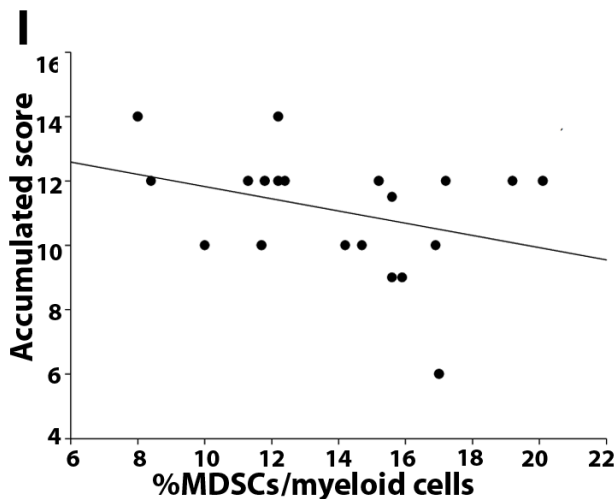
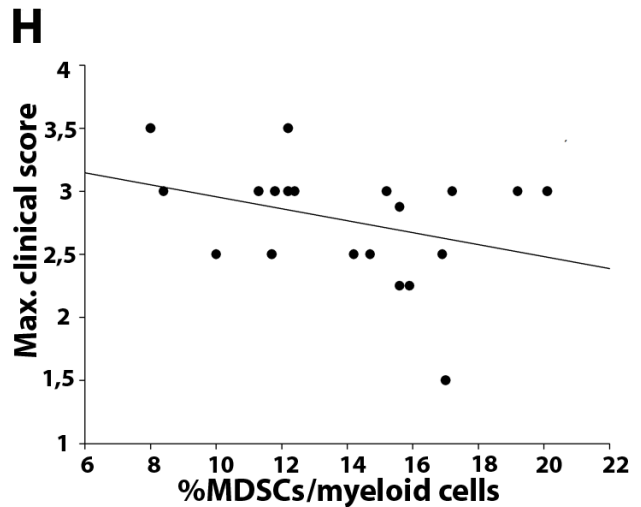
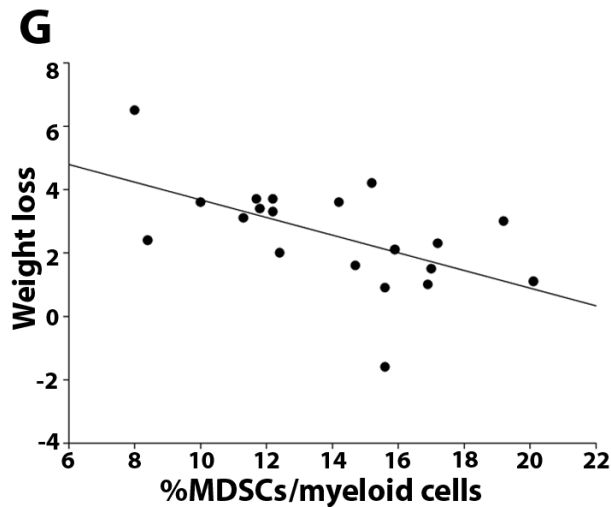
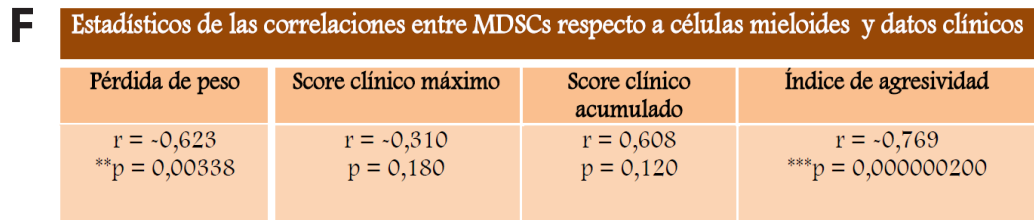


Figura 29. El porcentaje de MDSCs se correlaciona de forma inversa y significativa con la evolución clínica. A y F: Tablas resumen de los valores estadísticos obtenidos al correlacionar el porcentaje de MDSCs respecto a esplenocitos totales (A) y respecto a células mieloides CD11b⁺ (F) con los diferentes parámetros clínicos. B-D: Gráficas de las correlaciones encontradas entre la población de EMDSCs respecto a esplenocitos totales (B-D) y células mieloides (G-J) y la pérdida de peso (B, G), el score máximo alcanzado (C, H), el score acumulado (D, I) y el índice de agresividad (E, J). El tamaño muestral comprende 20 ratones. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman, donde el valor mínimo de significatividad fue $p < 0,05$.

De esta forma se puede concluir que un mayor porcentaje de MDSCs en el sistema inmune periférico está relacionado con una menor agresividad del curso clínico de la EAE. Por otra parte, el análisis de los datos del componente linfóide de células

T (CD3⁺) confirmó su influencia en la evolución de la enfermedad, ya que las correlaciones encontradas tanto en la población de linfocitos CD4⁺ como CD8⁺ con la pérdida de peso y la agresividad, fueron en todo caso directas y significativas

(no se muestran los datos por no aportar respuesta a la pregunta biológica de este objetivo).

A continuación, y teniendo en cuenta que el principal mecanismo inmunosupresor conocido

de las MDSCs hasta el momento es la supresión de los linfocitos T, quisimos comprobar la correlación estadística existente entre estas dos poblaciones.

A

Estadísticos de las correlaciones entre linfocitos respecto a esplenocitos totales y MDSCs			
Población/Parámetro	% CD3 ⁺	% CD4 ⁺	% CD8 ⁺
% MDSCs/total esplenocitos	r = -0,815 ***p = 0,000000200	r = -0,799 **p = 0,000000200	r = -0,819 ***p = 0,000000200
% MDSCs/myeloid cells	r = -0,586 **p = 0,00664	r = -0,611 **p = 0,00428	r = -0,618 **p = 0,00370

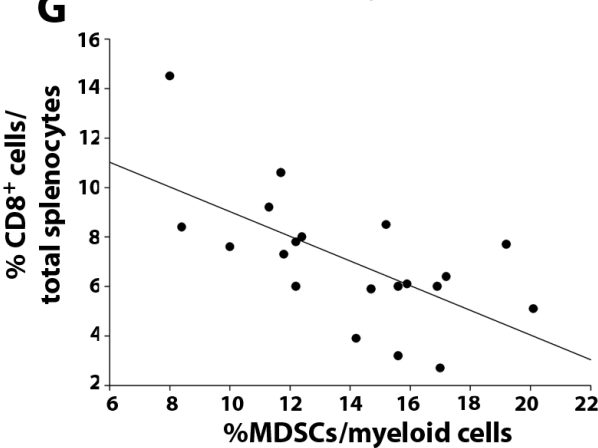
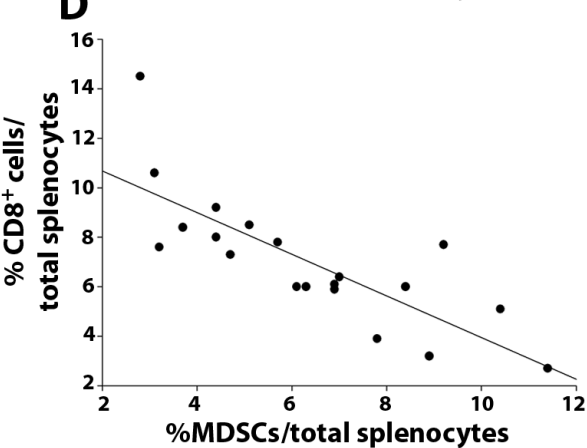
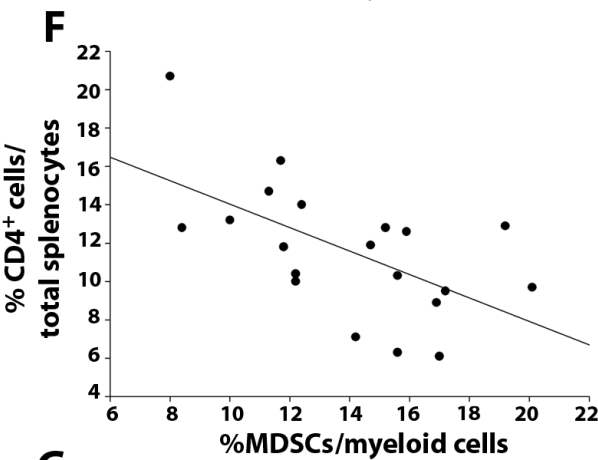
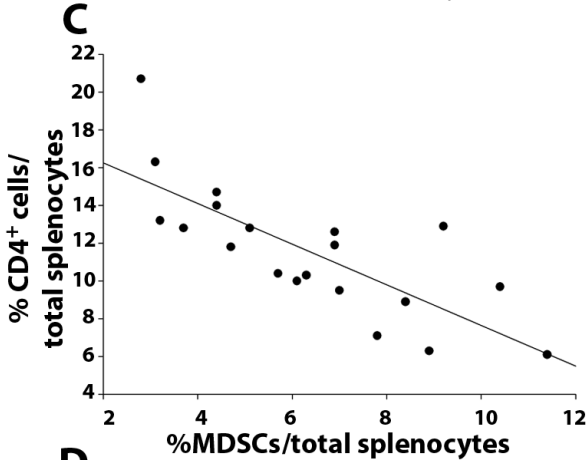
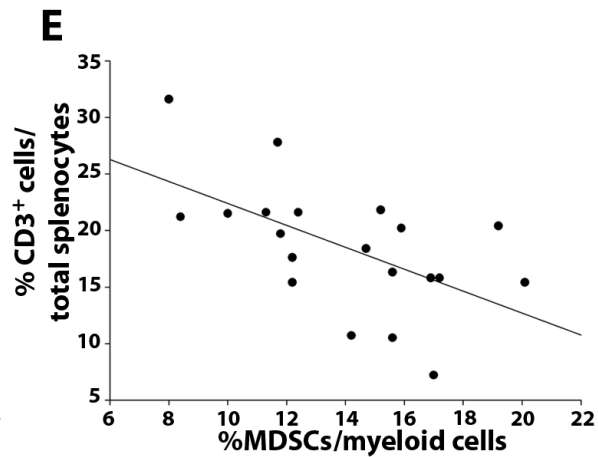
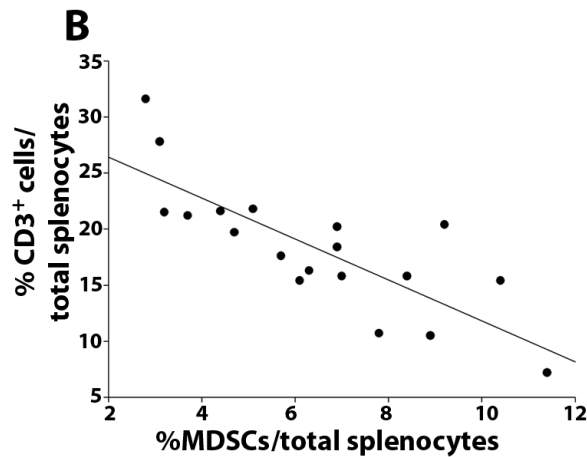


Figura 30. El contenido esplénico de MDSCs y linfocitos T CD4+ y CD8+ están inversamente relacionados. A: Tabla resumen de los valores estadísticos de las correlaciones encontradas entre las población de MDSCs y las poblaciones de linfocitos T CD3+, y sus subpoblaciones, CD4+ y CD8+. B-G: Gráficas de las correlaciones inversas existentes entre el porcentaje de MDSCs, tanto respecto a esplenocitos totales (B-D) como a la población mieloide (E-G), y el porcentaje de linfocitos T CD3+ (B, E), CD4+ (C, F) y CD8+ (D, G). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman, donde el valor mínimo de significatividad fue $p < 0,05$.

En el bazo de ratones con EAE en el pico de su curso clínico se comprobó la correlación inversa y significativa entre el porcentaje de MDSCs tanto respecto al total de esplenocitos como al componente mieloide con la población de linfocitos T CD3+ ($r = -0,815$, $p < 0.001$; $r = -0,585$, $p < 0.01$, respectivamente), así como con las dos subpoblaciones clásicas, CD4+ ($r = -0,799$, $p < 0,001$; $r = -0,611$, $p < 0.01$, respectivamente) y CD8+ ($r = -0,819$, $p < 0,001$; $r = -0,618$, $p < 0,01$, respectivamente; Figura 30A-G).

Las correlaciones presentadas en este apartado apuntaban a una influencia diferencial del porcentaje de MDSCs esplénicas en la evolución del curso clínico de la EAE, siendo un porcentaje alto indicativo de una enfermedad más leve, y relacionado con el porcentaje de las poblaciones linfoides. Cuyo se compararon las poblaciones esplénicas de los ratones con distintos comportamientos en cuanto a evolución clínica, basados en una división por la mediana del índice de agresividad, se comprobó que el porcentaje de MDSCs respecto a esplenocitos totales en los ratones con alto índice de agresividad era significativamente menor respecto a aquello con bajo índice de agresividad ($AI < 0,55$: $7,85 \pm 0,744$; $AI > 0,55$: $4,79 \pm 0,468$; Figura 31).

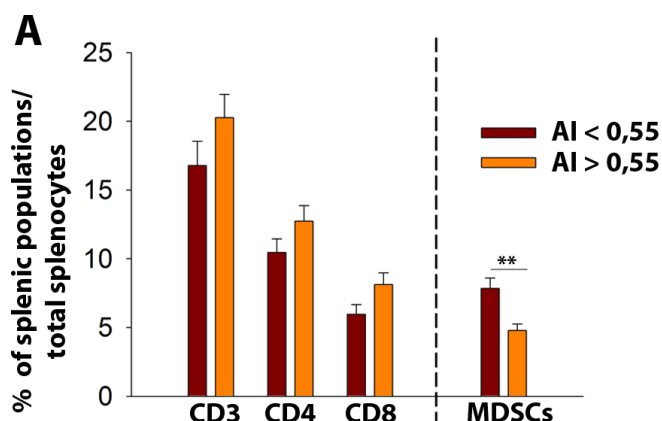


Figura 31. La población de MDSCs es menos abundante en ratones con un curso clínico de la EAE más severo. A: Histograma que refleja los porcentajes de las diferentes poblaciones y subpoblaciones linfoides y de MDSCs, en el que se observa una disminución significativa de estas últimas en los animales con un índice de agresividad por encima de la mediana. Para la estadística se utilizó el test t de Student para muestras pareadas, donde $*p < 0,05$.

2.3 La carga periférica de MDSCs está relacionada con la apoptosis de linfocitos T en el SNC

Como se ha comentado anteriormente, la principal vía a través de la cual las MDSCs ejercen su función supresora de la respuesta inmune es mediante el bloqueo de la proliferación y la inducción de anergia y/o apoptosis de los linfocitos T autorreactivos CD4+ (células principalmente afectadas en la EAE) y CD8+ (en EM y EAE). Como se ha mostrado en el epígrafe anterior, la abundancia de las dos subpoblaciones de linfocitos del bazo está inversamente relacionada con el porcentaje de MDSCs de forma periférica.

Con el objetivo de estudiar la presencia y viabilidad de los linfocitos T infiltrados en el sistema nervioso central de ratones con distinto índice de agresividad, se analizó el nivel de apoptosis de una de las subpoblaciones, los CD4⁺, mediante la combinación del marcaje con CD4 y la técnica de TUNEL, que marca células en apoptosis, y se relacionó con la abundancia de MDSCs periféricas. Para este estudio, y todos los realizados en tejido, se analizaron 12 ratones de la muestra original. Las correlaciones encontradas entre el índice de agresividad y el porcentaje esplénico de MDSCs se mantuvieron tanto respecto a esplenocitos totales

($r = -0,641$, $p < 0,05$) como respecto a células mieloides ($r = -0,695$, $p < 0,05$; Figura 32 A-B).

El análisis del tejido demostró que tanto la densidad como el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ en apoptosis se correlacionaba de forma directa con el porcentaje de MDSCs del bazo, tanto respecto a esplenocitos totales (porcentaje: $r = 0,710$; $p < 0,05$; densidad: $r = 0,618$, $p < 0,05$) como respecto a la población mieloides (porcentaje: $r = 0,604$, $p < 0,05$; densidad: $r = 0,585$, $p < 0,05$; Figura 33), lo que refuerza de la idea de las MDSCs como reguladoras, de forma tanto periférica como central, de la apoptosis de los linfocitos T CD4⁺.

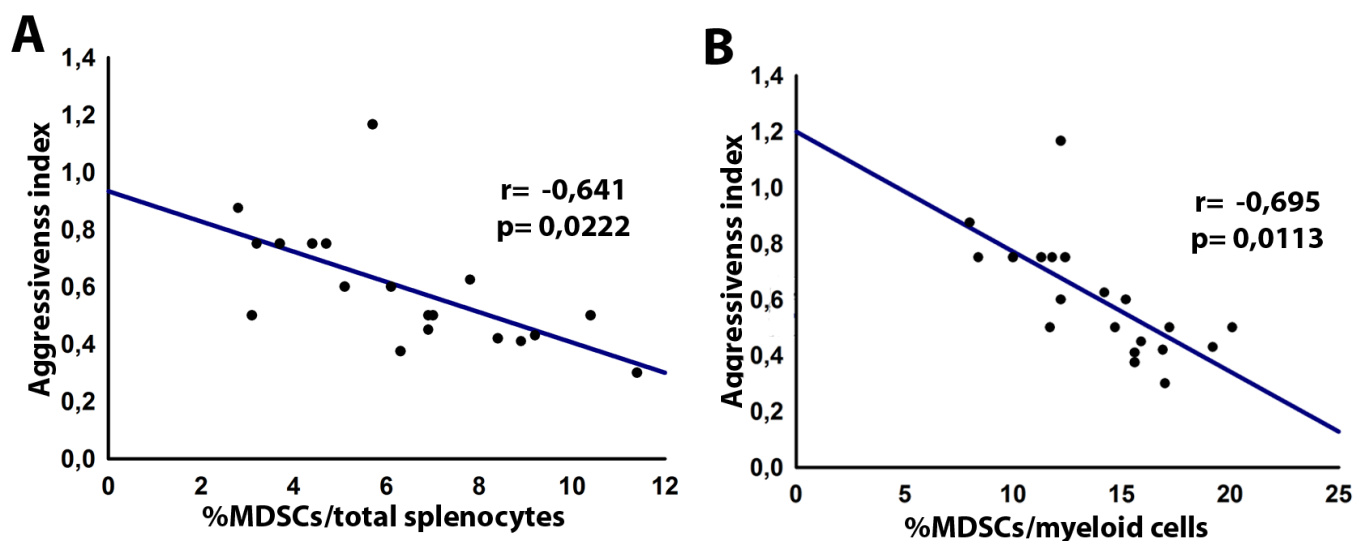


Figura 32. Gráficas de correlación de los 12 ratones seleccionados para los análisis de tejido. A, B: Gráficas que representan las correlaciones inversas y significativas entre el índice de agresividad y las MDSCs respecto a esplenocitos totales (A) y células mieloides (B). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman, donde el valor mínimo de significatividad fue $p < 0,05$.

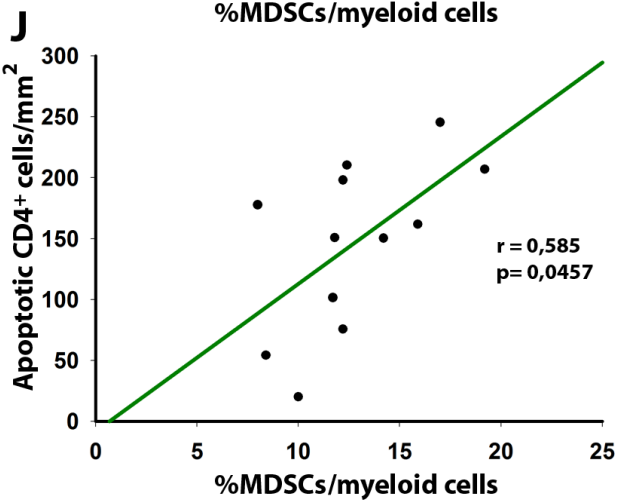
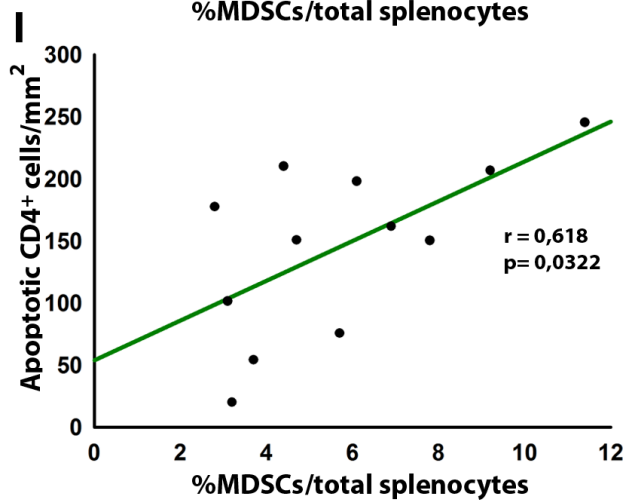
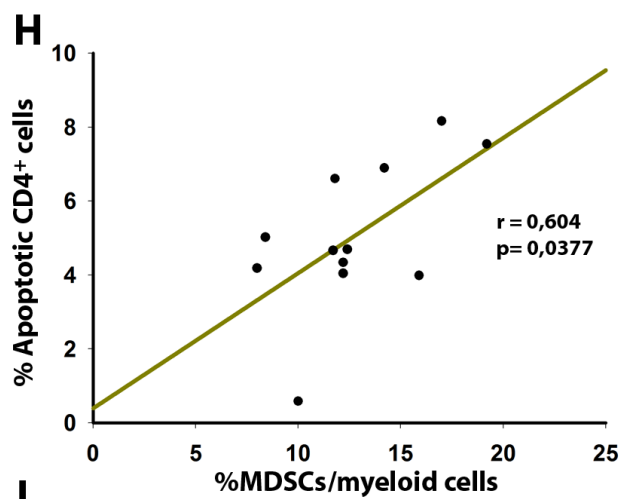
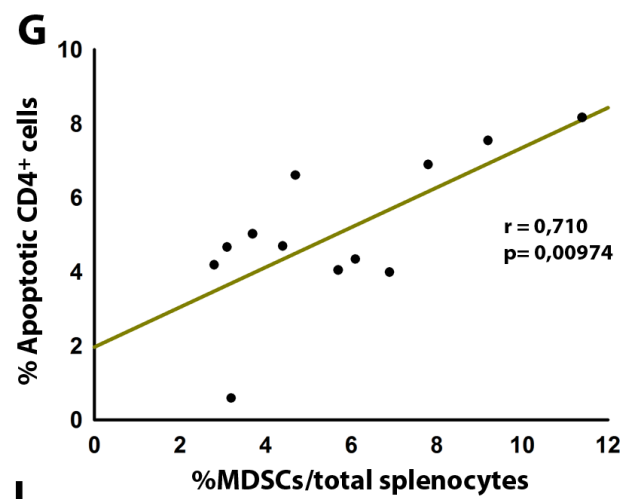
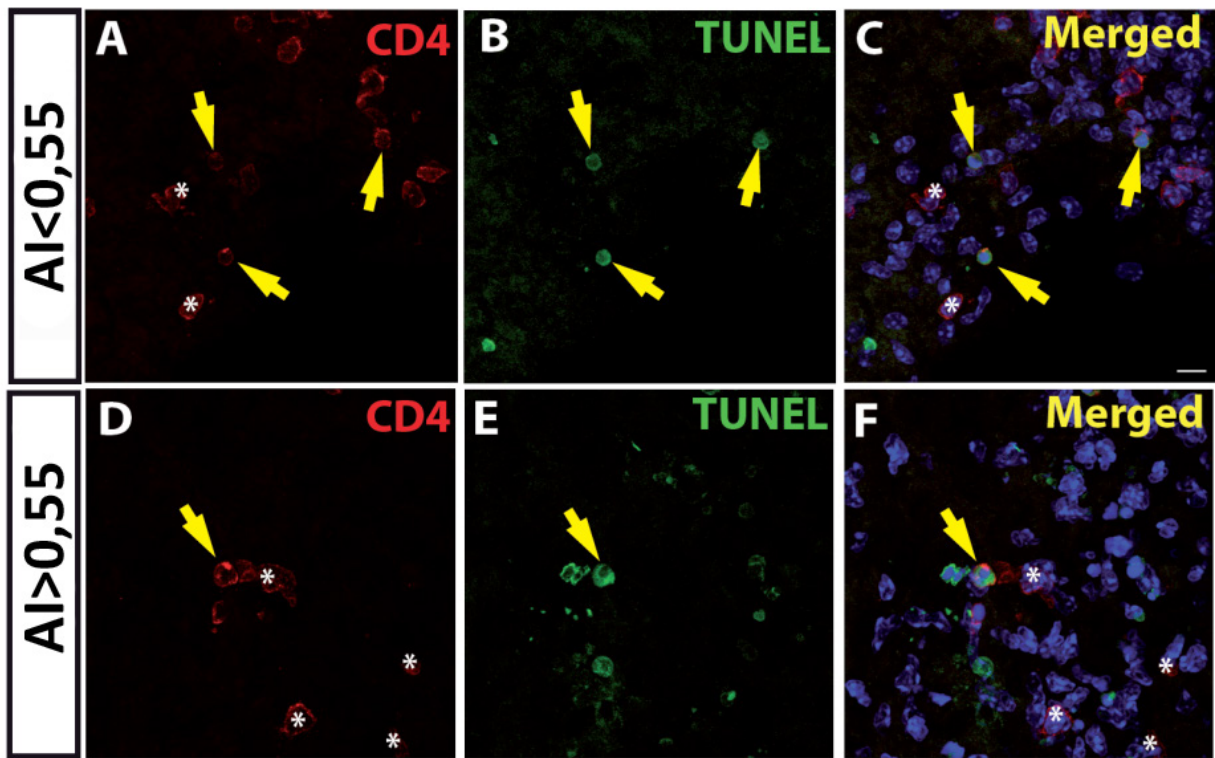


Figura 33. El grado de apoptosis de linfocitos T CD4⁺ en la médula espinal es más prominente en los ratones con un índice de agresividad mayor. A-F: Imágenes representativas de una lesión de un ratón con un bajo (A-B, AI< 0,55) y alto índice de agresividad (D-E, AI< 0,05), en las que se muestra un mayor número de células CD4⁺ (en rojo) marcadas con TUNEL (en verde) en la primera. Las flechas amarillas apuntan a células doblemente marcadas y los asteriscos a células CD4⁺ G-H: Gráficas de las correlaciones estadísticas encontradas entre el porcentaje (G-H) y la densidad (I-J) de los linfocitos T CD4⁺ y el porcentaje de MDSCs periférico respecto a esplenocitos totales (G-I) y a células mieloides (H-J). El tamaño muestral es de 12 ratones. La barra de escala representa 10 μ m. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el coeficiente de correlación de Pearson donde el valor mínimo de significatividad fue $p < 0,05$.

2.4 La destrucción de mielina y el daño axonal es mayor en ratones con una EAE más severa

Puesto que una de las principales marcas de este modelo, con el consiguiente reflejo en la evolución clínica, es la concurrencia de afectación neurológica con el ataque del sistema inmune, analizamos el daño provocado en el tejido nervioso atendiendo a dos aspectos: grado de desmielinización y daño axonal.

En primer lugar, y puesto que ésta es una característica histopatológica claramente relacionada con la evolución sintomatológica del grupo experimental (Moliné-Velázquez et al., 2011; Moliné-Velázquez et al., 2014), se estudió el grado de desmielinización en ratones con distinta evolución clínica de la EAE, mediante la utilización de la tinción de eriocromo cianina, con la cual las zonas desmielinizadas pierden la tinción azul de la sustancia blanca (Figura 34 A-B). Se confirmó la correlación directa y significativa entre el índice de agresividad del curso clínico y los dos parámetros utilizados para el estudio de la desmielinización, el tamaño del área desmielinizada y el porcentaje de área desmielinizada respecto al total de área de sustancia blanca (Figura 34C-D). Además, se encontró una relación inversa y muy significativa entre el porcentaje que la población de MDSCs del bazo representaba respecto a esplenocitos totales y respecto a la población mieloide y el grado de desmielinización de la

médula espinal ($r = -0,664$, $p < 0,05$; $r = -0,749$, $p < 0,001$, respectivamente; Figura 34 E-F).

Como la consecuencia directa de una desmielinización total y/o prolongada de tipo inflamatorio es la afectación de los axones (Dandekar et al., 2001; Haines et al., 2011) se quiso estudiar el grado de daño axonal presente en la médula espinal de ratones con EAE que habían experimentado diferente grado de agresividad en su evolución clínica, y si éste tenía alguna relación con la carga esplénica de MDSCs. Para ello, se utilizó un marcaje específico para la forma no fosforilada de la proteína de neurofilamentos NFH (SMI-32), marcaje que se utiliza para la detección de axones dañados en EM (O'Sullivan et al., 2017; Wegner et al., 2006). Como se observa en las imágenes, el daño axonal de la sustancia blanca es más prominente en aquellos ratones con un índice de agresividad superior a 0,55, tanto dentro del área lesionada como en la sustancia blanca profunda (Figura 35A-C). Como ocurrió en el caso de la mielina, el tamaño del área con daño axonal se correlacionaba de forma directa y significativa con el índice de agresividad ($r = 0,648$; $p < 0,05$; Figura 35G), así como el porcentaje que esta área representaba respecto al total de la sustancia blanca ($r = 0,694$; $p < 0,05$; Figura 35F).

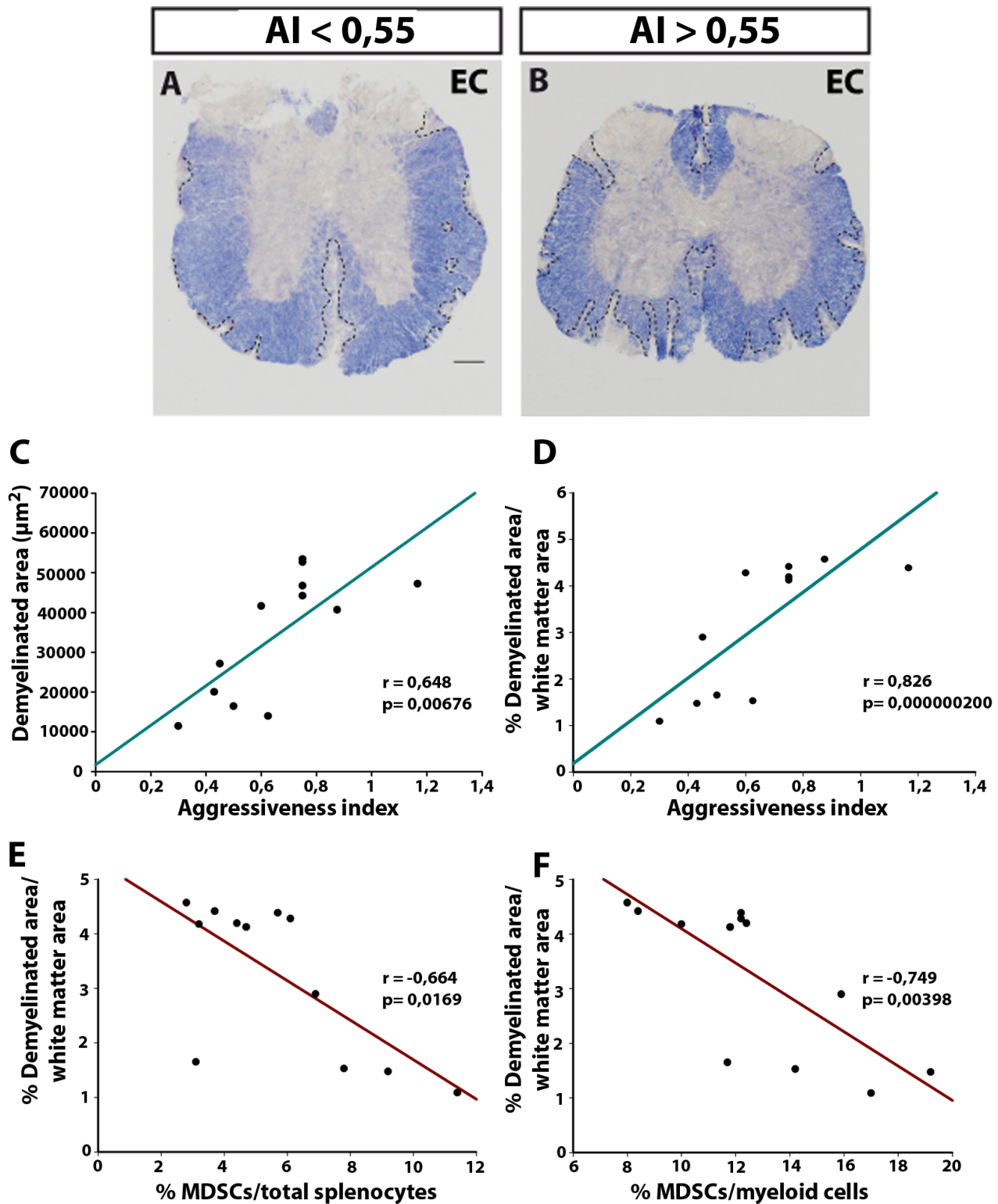


Figura 34. La abundancia de MDSCs del sistema inmune periférico es un indicador del grado de desmielinización de la médula espinal. A-B: Imágenes panorámicas representativas de una sección de médula espinal con tinción de eriocromo cianina (aumento de 20X) de un ratón con un bajo (A) y alto índice de agresividad (B), con las zonas desmielinizadas delimitadas por una línea discontinua. C-D: Gráficas de las correlaciones encontradas directas y significativas entre el índice de agresividad y el área desmielinizada (C) y el porcentaje de área desmielinizada (D). E-F: Gráficas de las correlaciones encontradas directas y significativas entre el porcentaje de MDSCs respecto a esplenocitos totales (E) y respecto a células mieloides (F) y el porcentaje de área desmielinizada. La barra de escala representa 200 μm . Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el coeficiente de correlación de Pearson, o en su defecto, el coeficiente de Spearman, donde el valor mínimo de significatividad fue $p < 0,05$.

Para saber si el daño axonal asociado a una diferente evolución de la enfermedad estaba relacionado con la abundancia de MDSCs periféricas, se comparó tanto el tamaño del área que

presentaba daño axonal como el porcentaje con el porcentaje de MDSCs, obteniéndose en todo caso una correlación inversa y significativa (Fig. 30 G-J).

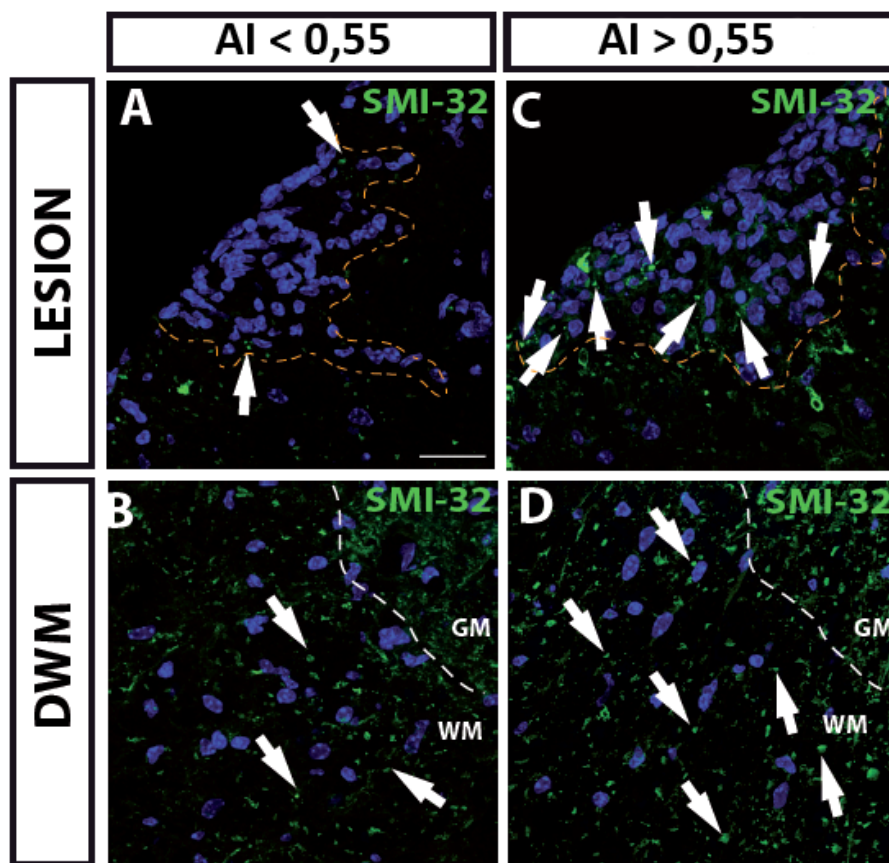


Figura 35. La médula espinal de ratones con una EAE más severa muestran un mayor daño axonal, en una relación directa con el contenido esplénico de MDSCs. A-D: Vistas panorámicas de secciones transversales de la médula espinal de ratones que presentaban un índice de agresividad bajo ($AI < 0,55$; A, B) y alto ($AI > 0,55$; C, D), en el que se realizó una inmunofluorescencia para daño axonal con el marcador SMI-32 (en verde), con el área lesionada delimitada por la línea naranja discontinua. E-F: Gráficas que muestran la correlación significativa y directa entre el índice de agresividad y el tamaño del área positiva para el marcador SMI-32 (E) y el porcentaje que ésta representa respecto al total de sustancia blanca (F). G-J: Gráficas de las correlaciones entre el porcentaje de MDSCs respecto a esplenocitos totales (G, H) y a células mieloides (I, J) con el tamaño del área con daño axonal (G, I) y porcentaje de área con daño axonal respecto al total del área de sustancia blanca (H, J). Las flechas blancas apuntan a axones positivos para SMI-32, cortados de forma transversal, y en azul aparecen los núcleos teñidos con Hoechst. La barra de escala representa 25 μm . Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el coeficiente de correlación de Pearson, o en su defecto, el coeficiente de Spearman, donde el valor mínimo de significatividad fue $p < 0,05$.

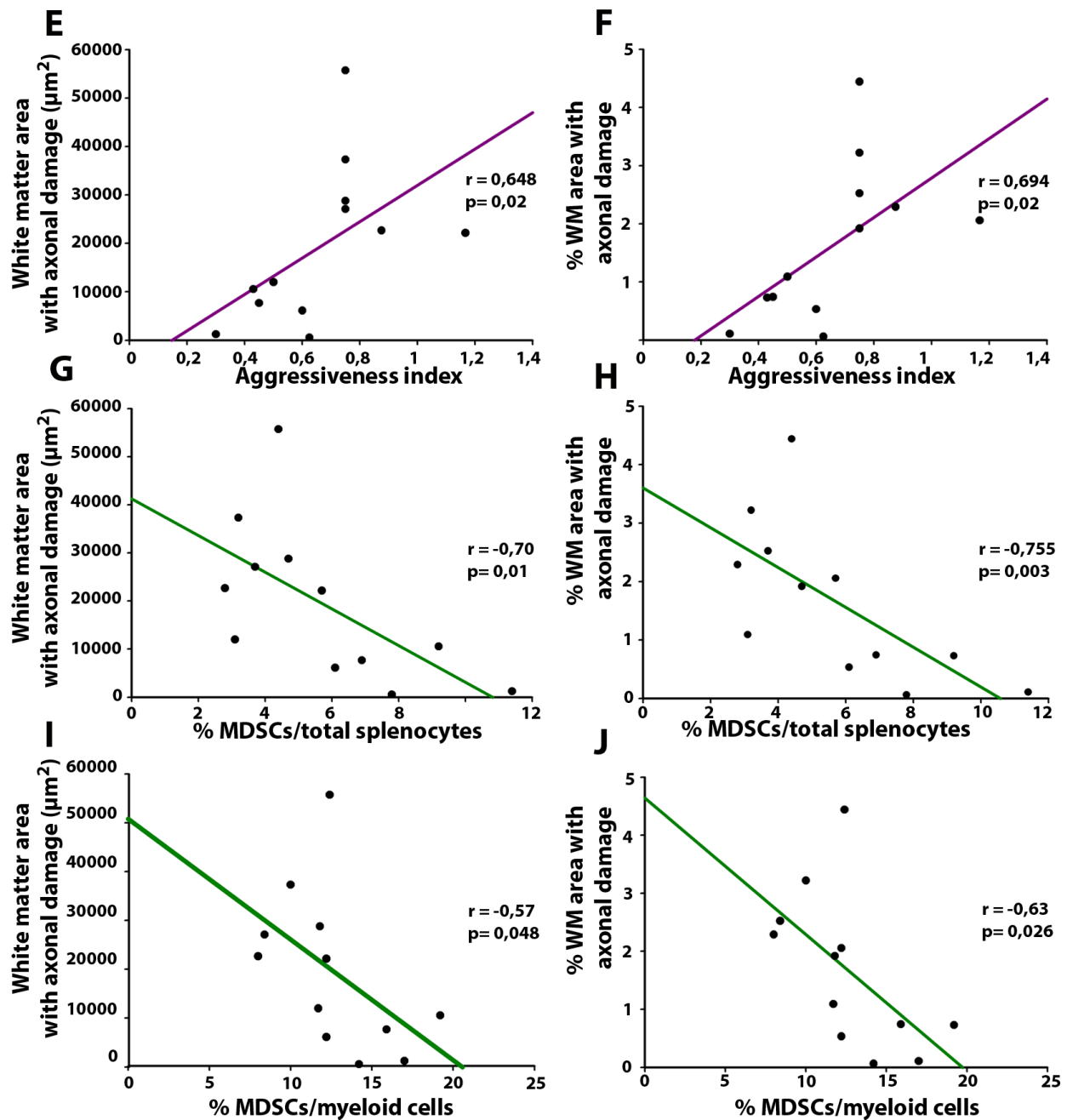


Figura 35 (Continuación).

De esta forma, se puede hablar de que existe una participación al menos parcial de esta población en el desarrollo y severidad de la EAE, puesto que el porcentaje la población de MDSCs sirve como indicador de diferentes aspectos relacionados con la severidad de la EAE.

Todos estos datos apuntan a que el contenido periférico de MDSCs se correlaciona de forma significativa con una mayor apoptosis de los linfocitos T CD4^+ (cuya promoción está descrita como el principal mecanismo a través del cual las MDSCs ejercen su función), con una menor desmielinización de la sustancia blanca y con el subsiguiente menor daño axonal.

3. LAS MDSCS EJERCEN UN EFECTO PRO-REGENERATIVO SOBRE LA MIELINA, LAS CÉLULAS PRODUCTORAS DE MIELINA Y SUS PRECURSORES

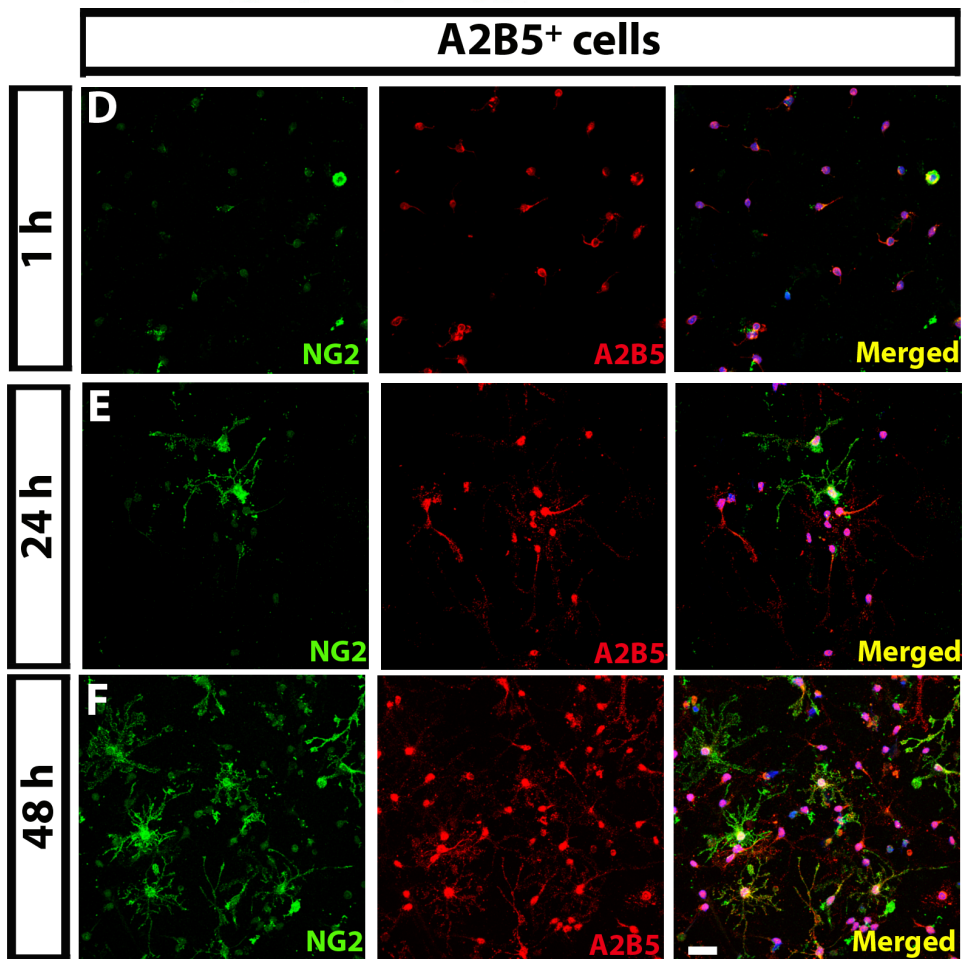
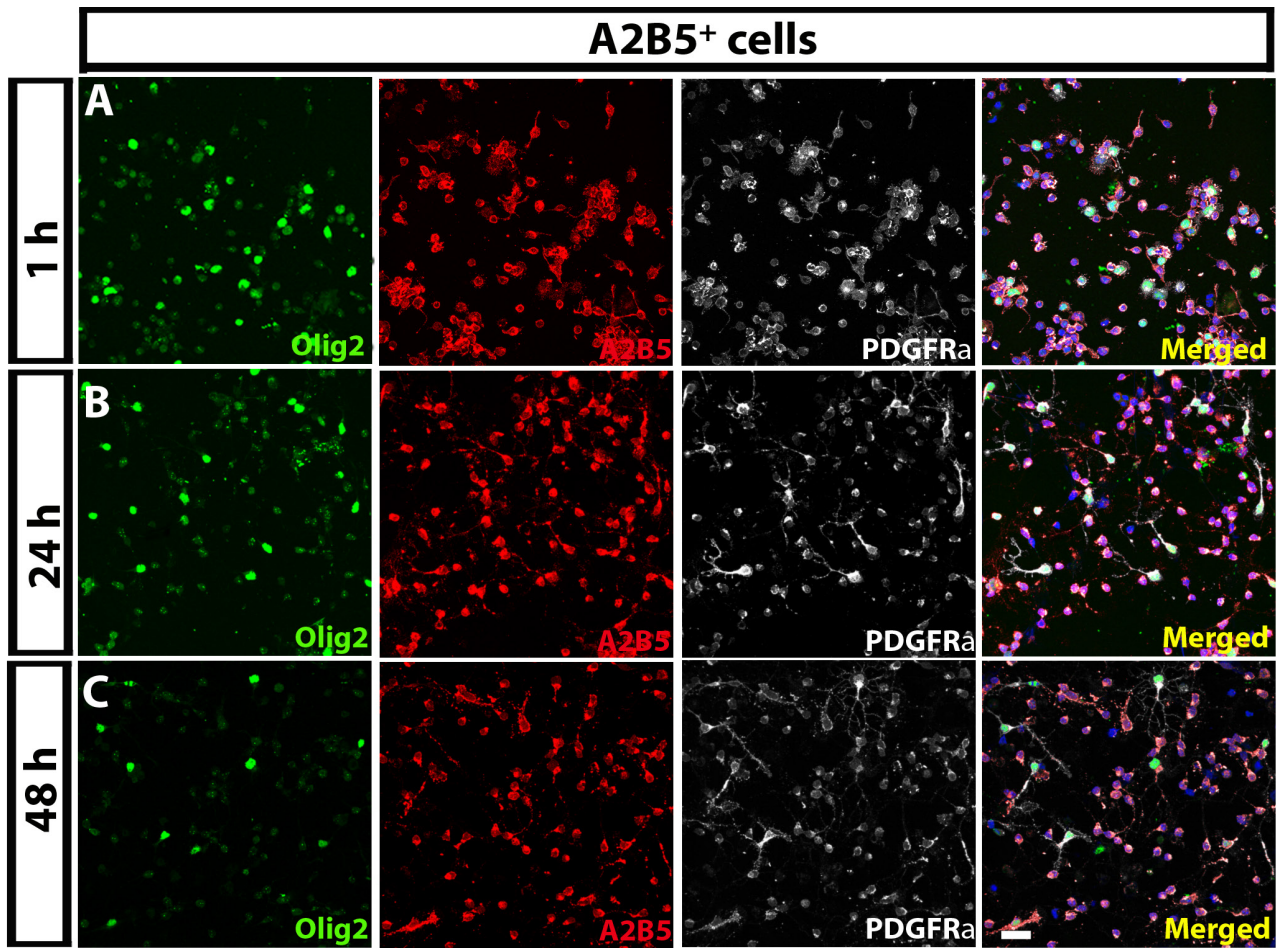
El hecho de que una mayor presencia de estas células en órganos del sistema inmune periférico esté inversamente relacionada con un menor daño tisular aporta la base para hipotetizar un posible efecto neuroprotector/neuroregenerador de estas células sobre la mielina y las células productoras de mielina, es decir, oligodendrocitos y sus precursores. Al estudio de esta hipotética función nunca antes descrita para las MDSCs se dedica este bloque.

En el apartado anterior se ha descrito el uso de esta población celular como indicador de severidad de la enfermedad en términos de evolución clínica y daño tisular. Esto permite establecer un nexo de unión entre una población inmune reguladora de forma periférica, siendo además uno de los principales componentes del infiltrado celular, con la biología de la mielina y los oligodendrocitos. Teniendo en cuenta el ya demostrado papel de las células inmunes de tipo M2 en los procesos regenerativos que tienen lugar en el SNC tras un insulto desmielinizante (Dombrowski et al., 2017; Miron et al., 2013), y las características funcionales y bioquímicas de las MDSCs que permiten incluirlas dentro de la categoría de células reguladoras, existen motivos más que suficientes para pensar en un rol similar de las MDSCs sobre los procesos de mielinización/remielinización.

Para estudiar si las MDSCs ejercían un efecto regenerativo sobre el tejido y las células del SNC distinto de la inmunosupresión de las células

inmunes infiltradas, se tomó ventaja de dos abordajes experimentales complementarios. Por una parte, se utilizaron cultivos primarios de células precursoras de oligodendrocitos (OPCs) aislados de corteza cerebral de ratones neonatales (P0) pertenecientes a distintos estadios de maduración (células A2B5⁺ y células O4⁺, Figura 36-37) y se analizó su comportamiento en cuanto a supervivencia, migración, proliferación y diferenciación hacia fenotipos mielinizantes. Por otro lado, se utilizaron cultivos organotípicos de rodajas de cerebelo de ratones neonatales (P7) durante la tercera y más importante ventana temporal de mielinización activa en ratón (Kessaris et al., 2006; van Tilborg E. et al., 2018; Zhang and Goldman, 1996). En ambos casos, se estudió el efecto que ejercía el medio condicionado de MDSCs purificadas de bazo de ratones con EAE en el punto de máxima afectación neurológica y cultivadas durante 24 horas en medio IMDM suplementado (ver apartado “Material y Métodos”), como un primer paso para conocer si los factores solubles producidos por las MDSCs ejercían algún efecto neuroprotector sobre los OPCs.

Para ello, se realizó una caracterización del cultivo celular de las células A2B5⁺ (Figura 36) y O4⁺ (Figura 37), con los marcadores más usados: Olig2, NG2, PDGFRα, Sox10, A2B5 y O4.



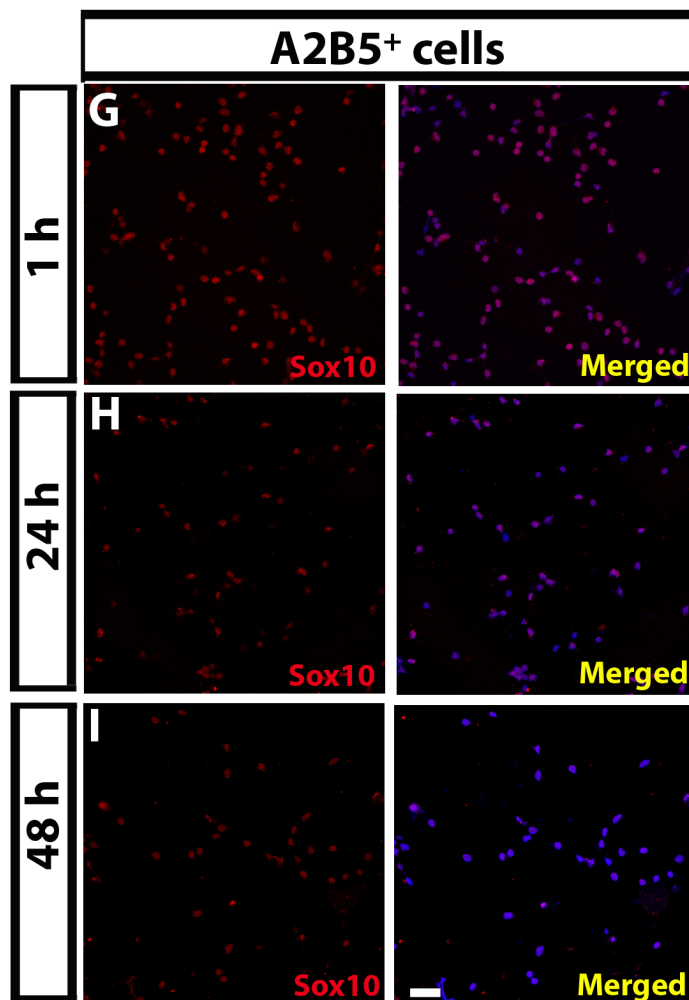


Figura 36. Caracterización del cultivo celular de las células A2B5⁺, aisladas de cortezas de ratones P0 mediante el método de MACS, a 1 hora , 24 horas y 48 horas tras el aislamiento. A-C: Imágenes representativas del cultivo, donde las células aparecen marcadas por Olig2 (verde), A2B5 (rojo) y PDGFRA (blanco). Se observa la colocalización de los tres marcadores en todas las células del cultivo. D-F: Las células aparecen marcadas por NG2 (verde) y A2B5 (rojo), donde se observa un mayor marcaje de las prolongaciones conforme avanza el tiempo de cultivo, en los dos casos. G-I: Marcaje celular con el factor de transcripción Sox10 (rojo), donde se puede observar la colocalización con todos los núcleos del cultivo. La barra de escala representa 25 μ m.

3.1 Efecto de los factores solubles de las MDSCs sobre la biología de las células precursoras de oligodendrocitos

◇ 3.1.1 Los factores solubles producidos por las MDSCs aumentan la supervivencia de los OPCs

Como primera aproximación para el estudio de la supervivencia, se analizó el comportamiento de los OPCs sin estímulo apoptótico, según el esquema

de la figura 28. Para ello, las células A2B5⁺ y O4⁺ se cultivaron durante 48 horas en presencia del sobrenadante obtenido de MDSCs cultivadas durante 24 horas, a una proporción de 1:1 con el medio de proliferación de OPCs, condición que se denominará en adelante “MDSC-CM” (del inglés, *conditioned media*). La adición del sobrenadante se realizó transcurrida una hora de la siembra de los OPCs, de forma que se permitiera su recuperación y adhesión al sustrato.

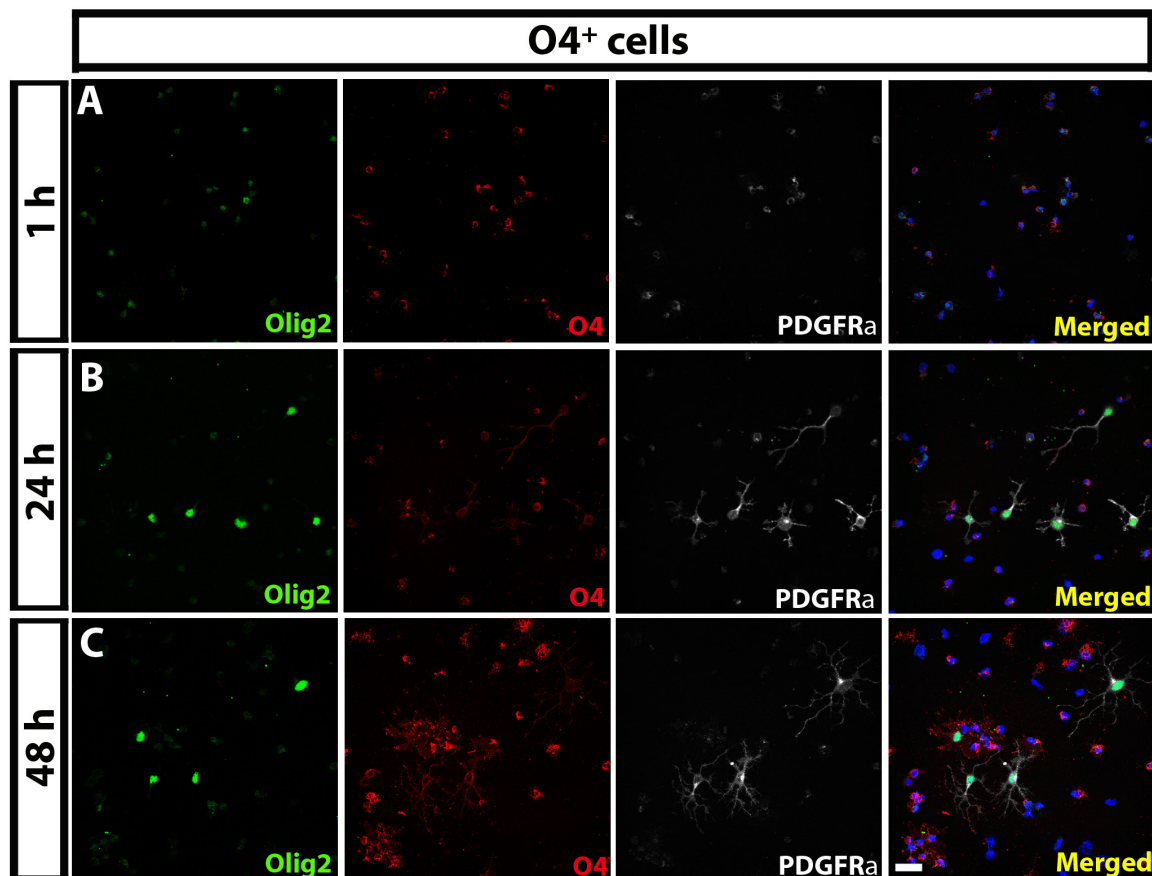


Figura 37. Caracterización del cultivo celular de las células O4⁺, aisladas de cortezas de ratones P0 mediante el método de MACS, a 1 hora , 24 horas y 48 horas tras el aislamiento. A-C: Imágenes representativas del cultivo, donde las células aparecen marcadas por Olig2 (verde), O4 (rojo) y PDGFRa (blanco). A las 48 horas de cultivo se observan células O4⁺ que no presentan marcaje para PDGFRa. La barra de escala representa 25 μ m.

Como condición “control” se utilizó el medio de proliferación establecido para el cultivo de OPCs aislados mediante separación magnética (cuya base es DMEM y F12, y suplementado on los factores de crecimiento PDGF-aa y bFGF para estimular la proliferación y evitar la diferenciación), y como condición “vehículo” se utilizó el medio IMDM suplementado, añadido también al 50 % en medio de OPCs.

Transcurridas 48 horas, los OPCs fueron fijados y analizados mediante la técnica TUNEL, que marca los núcleos de las células en apoptosis (Barateiro et al., 2014; Figura 38A). Se observó una promoción de la supervivencia de los OPCs tanto en estadios tempranos (A2B5⁺; Figura 38B-D) como

como tardíos (O4⁺; Figura 38-E-G) en contacto con el medio condicionado de MDSCs, comparado con las condiciones control y vehículo, mientras que no se observaron diferencias entre éstas (Figura 38H).

◇ 3.1.2 Los factores solubles producidos por las MDSCs aumentan la proliferación de los OPCs

A continuación, se quiso ver cuál era la proliferación de los OPCs en contacto con el con los factores solubles producidos por las MDSCs. Para ello, se aplicó un protocolo de incorporación del nucleótido sintético 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), el cual se intercala en el DNA de las células en división, apareciendo

por lo tanto en las células hijas y permitiendo hacer una estimación de la tasa de proliferación.

En este trabajo, se añadió BrdUa células aisladas de corteza de ratones neonatales utilizando el anticuerpo A2B5 y cultivadas durante 24 horas en las diferentes condiciones explicadas en el epígrafe anterior, y se aplicó un pulso del nucleótido durante 6 horas. Transcurrido ese tiempo, se refrescó el medio con las mismas condiciones y las células se fijaron tras 24 horas (Figura 39A).

En primer lugar, y aunque existe un aumento significativo entre las condiciones control y vehículo, la proliferación de los OPCs en los dos estadios de maduración se veía incrementada muy significativamente en contacto con medio condicionado de MDSCs respecto a las otras condiciones (Figura 39B-H)

◇ 3.1.3 Los factores solubles de las MDSCs no afectan a la motogenicidad de los OPCs

Para una efectiva regeneración de la mielina se requiere la activación de los OPCs, lo que conlleva la activación de su ciclo celular y su reclutamiento hacia las zonas de lesión. Una vez demostrado que los factores solubles producidos por las MDSCs favorecían la supervivencia y la proliferación de los OPCs in vitro en ausencia de estímulos de apoptosis y mitogenicidad, respectivamente, se quiso comprobar cuál era el efecto sobre su motogenicidad. Para ello, se utilizaron cámaras de quimiotaxis (o cámara de Boyden), las cuales se utilizan para medir la capacidad migratoria de las células que se siembran en el compartimento superior hacia

el inferior, que contiene los factores a estudiar, separados por una membrana de policarbonato de 8 μm de tamaño de poro. En este trabajo, se sembraron células A2B5⁺ en el compartimento superior en medio de proliferación y se pusieron en contacto con medio de proliferación en el compartimento inferior. Tras una hora, el medio del compartimento inferior se cambió por medio de proliferación y medio IMDM suplementado o medio condicionado de MDSCs al 50% en medio de proliferación. Tras 20 horas, se realizó una inmunocitoquímica en la parte inferior de la membrana para detectar la presencia de células A2B5⁺Olig2⁺.

Como se puede observar, aunque la sola presencia de vehículo redujo significativamente la migración de OPCs hacia el compartimento inferior con respecto a la condición control, no existen diferencias en comparación con la presencia de medio condicionado de MDSCs (Figura 40).

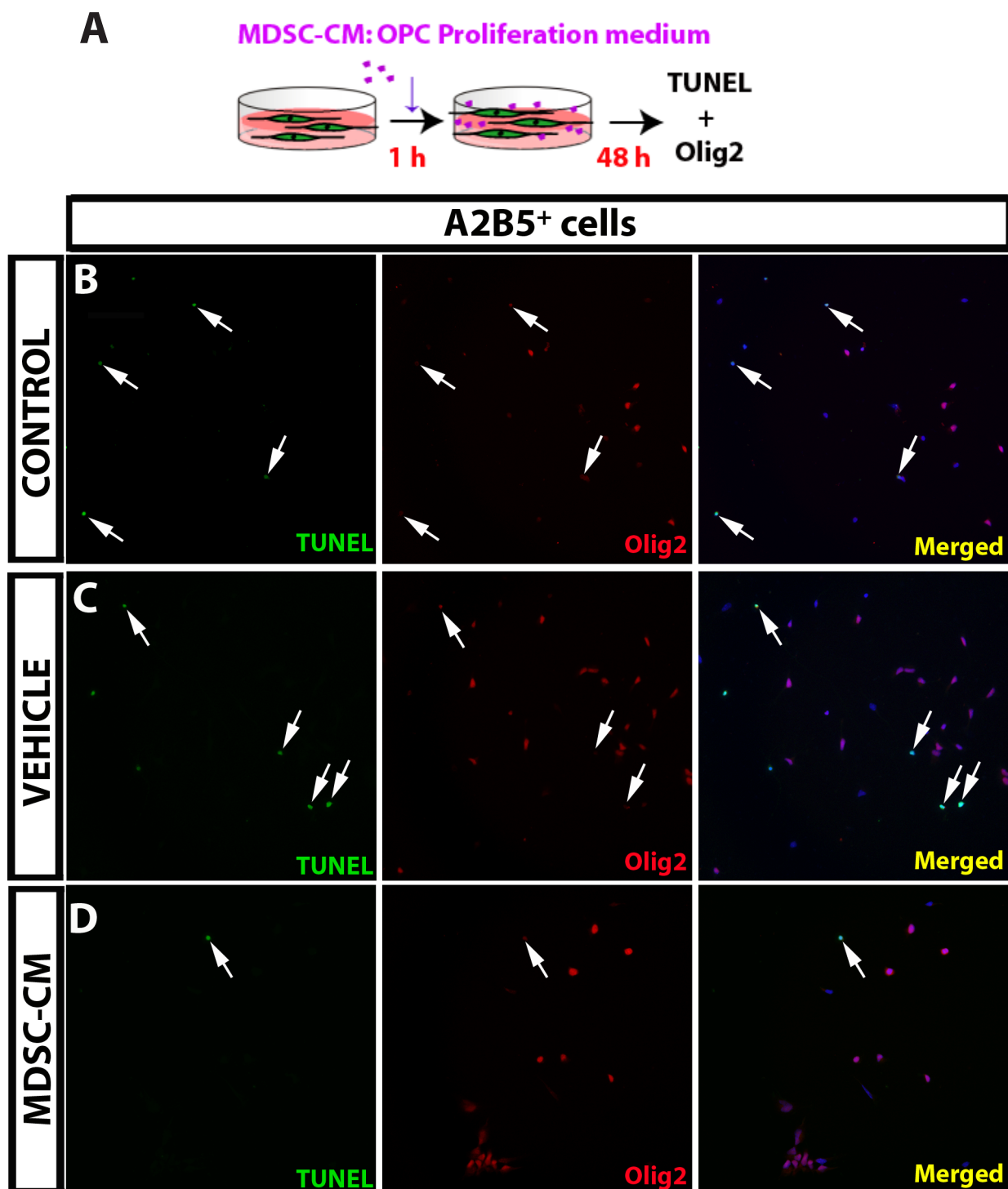


Figura 38. El medio condicionado de las MDSCs promueve la supervivencia de los OPCs tanto en estadios tempranos (A2B5⁺) como maduros (O4⁺). A: Esquema del protocolo utilizado. El medio condicionado de las MDSCs promueve la supervivencia de los OPCs tanto en estadios tempranos (A2B5⁺) como maduros (O4⁺). B-G: Imágenes representativas de los cultivos de células A2B5⁺ (B-D) y O4⁺ (E-G) en condiciones control (B; E), vehículo (C; F) y con MDSC-CM (D; G). Se muestran los OPCs marcados con Olig2 en rojo, y las células en apoptosis marcadas con TUNEL en verde. H: Representación gráfica del porcentaje de OPCs en apoptosis (TUNEL⁺Olig2⁺ cells) respecto al total de núcleos (marcados con Hoechst). Mientras que no se encontraron diferencias entre las condiciones vehículo y control, la apoptosis de las células Olig2⁺ es significativamente menor en la presencia del medio condicionado de MDSCs. Las flechas apuntan a células doblemente marcadas. La barra de escala representa 50 μ m. El análisis estadístico se realizó para tres experimentos independientes, utilizando el test ANOVA de una vía y el método de Dunn para comparaciones múltiples, donde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. Continúa en página siguiente.

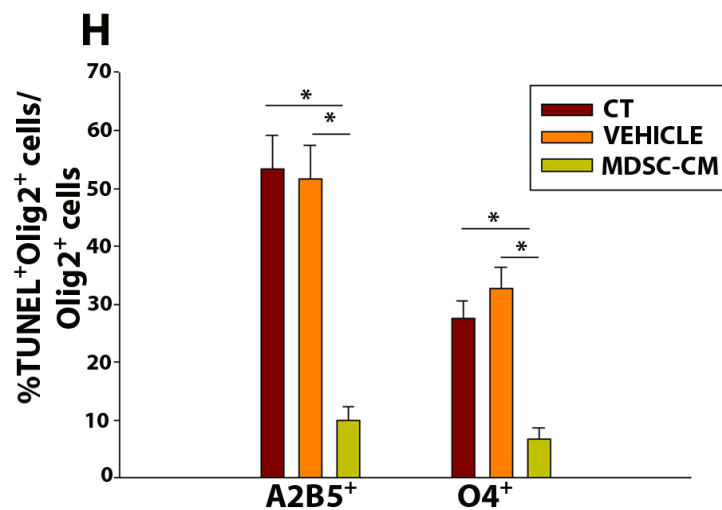
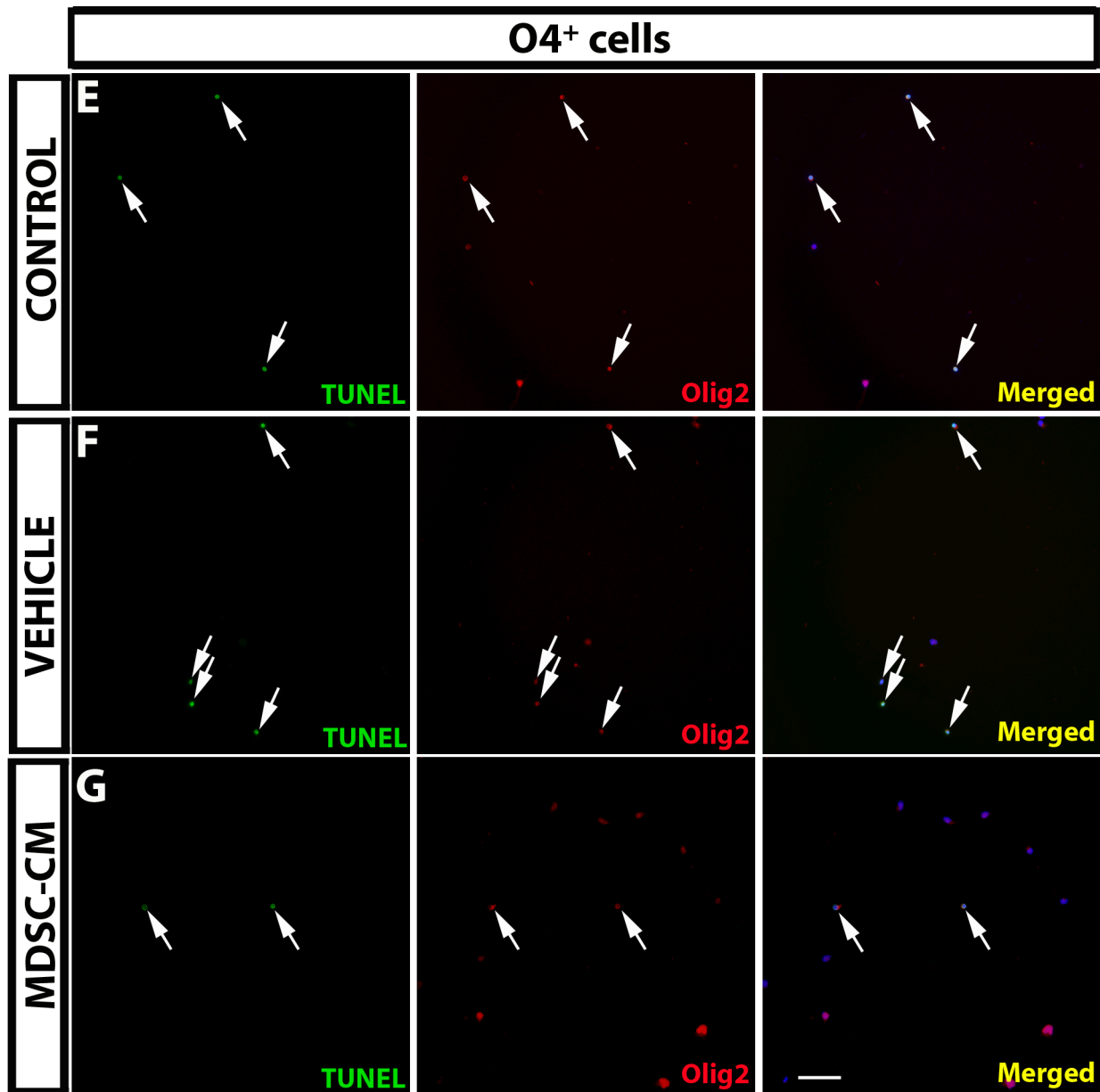


Figura 38 (continuación). El medio condicionado de las MDSCs promueve la supervivencia de los OPCs tanto en estadios tempranos (A2B5⁺) como maduros (O4⁺).

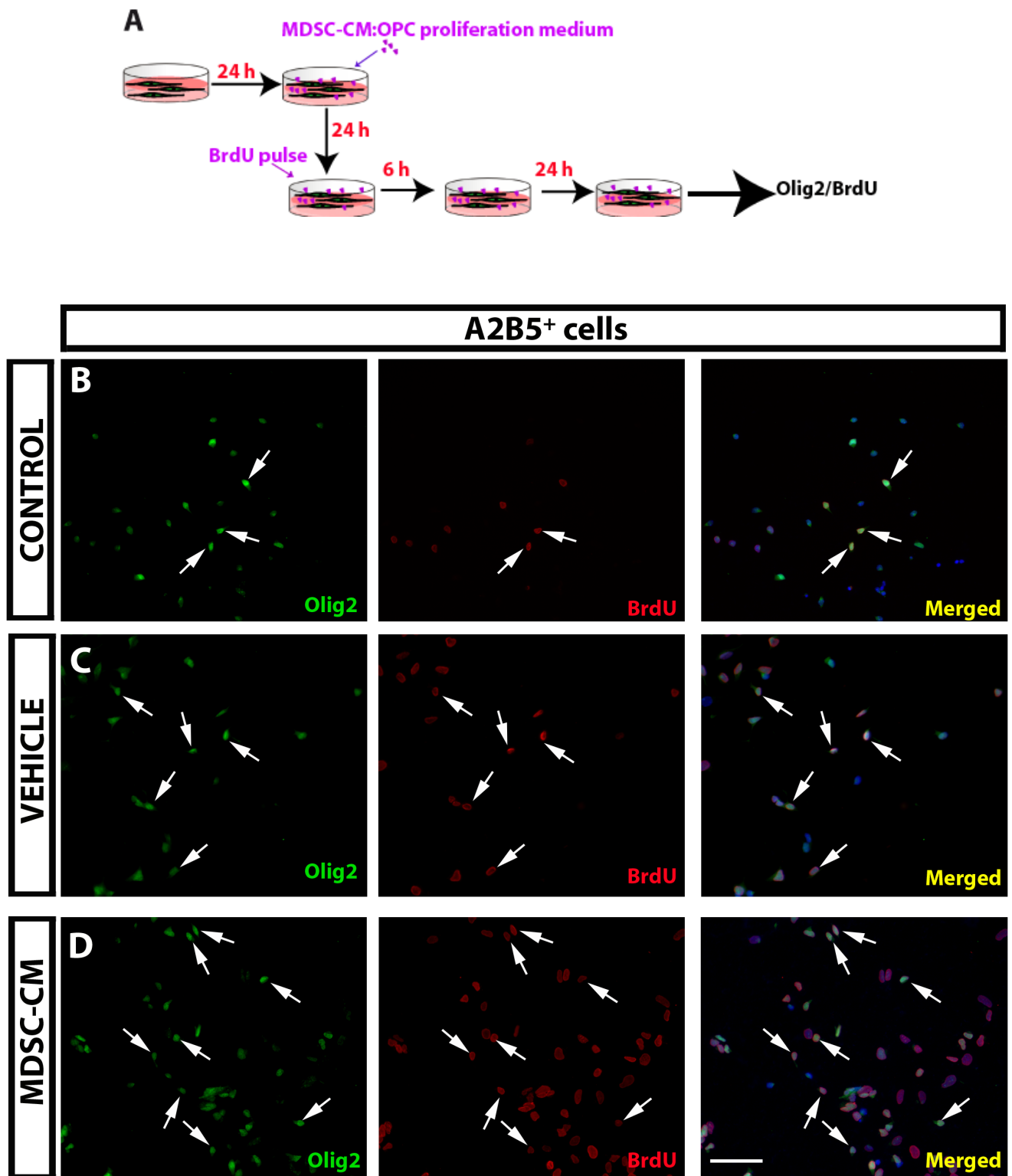


Figura 39. Las MDSCs incrementan la proliferación de los OPCs. A: Esquema del protocolo de incorporación de BrdU. B-D: Imágenes representativas de las células A2B5⁺ en condiciones control, vehículo y MDSC-MC. Las células aparecen marcadas con Olig2 en verde y BrdU en rojo. Continúa en la página siguiente.

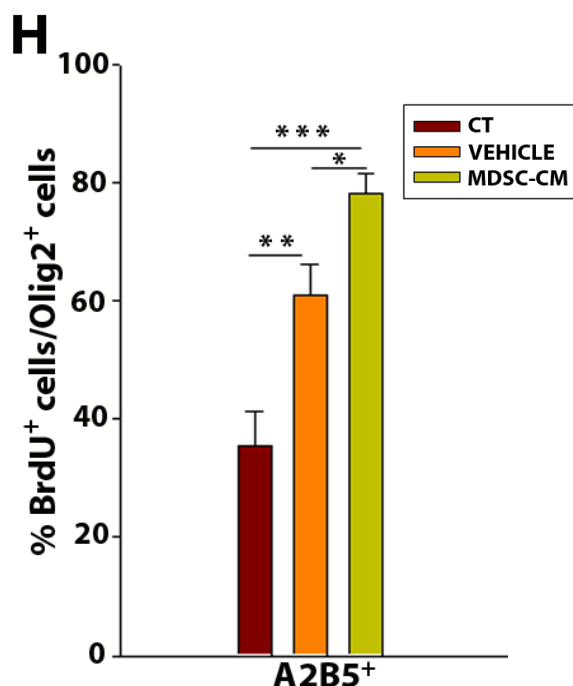


Figura 39 (continuación). Las MDSCs incrementan la proliferación de los OPCs. H: Representación gráfica del porcentaje de células BrdU+Olig2+ respecto al total de Olig2+, en la que se ve que existe un incremento significativo de la tasa de proliferación de las células aisladas en la condición de MDSC-MC respecto al resto de condiciones. Las flechas señalan células doblemente marcadas (Olig2+BrdU+). La barra de escala representa 53 μ m. El análisis estadístico se realizó utilizando el test ANOVA de una vía para la comparación entre condiciones, para tres experimentos independientes, donde *p< 0,05, **p< 0,01 y ***p< 0,001.

3.1.4 Los factores solubles de las MDSCs aumentan la diferenciación de OPCs a oligodendrocitos mielinizantes

Tras haber demostrado un efecto positivo de los factores solubles de las MDSCs sobre la supervivencia y la proliferación de los OPCs, se quiso estudiar la maduración de los precursores hacia fenotipos productores de mielina en presencia del medio condicionado de MDSCs. Por esta razón se diseñó un paradigma para el análisis de la diferenciación de células A2B5⁺ aisladas de cortezas de cerebro de ratón neonatal en cultivo con el medio condicionado de las MDSCs durante 6 días de cultivo (Figura 41A). En este caso, el medio de proliferación de OPCs utilizado en los tres paradigmas anteriores se reemplazó a las 24 horas por un medio de

diferenciación, con la misma composición de base pero sin los factores de crecimiento PDGF-AA y bFGF. La diferenciación de los oligodendrocitos se demostró mediante la inmunotinción con dos marcadores de madurez, la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (CNPasa) y la proteína básica de mielina (MBP); junto con el marcador de linaje oligodendroglial, Olig2. Se analizó la expresión de la proteína básica de mielina (MBP), marcador clásico de oligodendrocitos mielinizantes y uno de los componentes principales de las vainas de mielina (figura 41B-D). Con este análisis se pudo ver que las MDSCs inducían un mayor grado de diferenciación de los OPCs en comparación tanto con el control como con la condición vehículo, medida como el área ocupada por MBP por campo (Figura 41E).

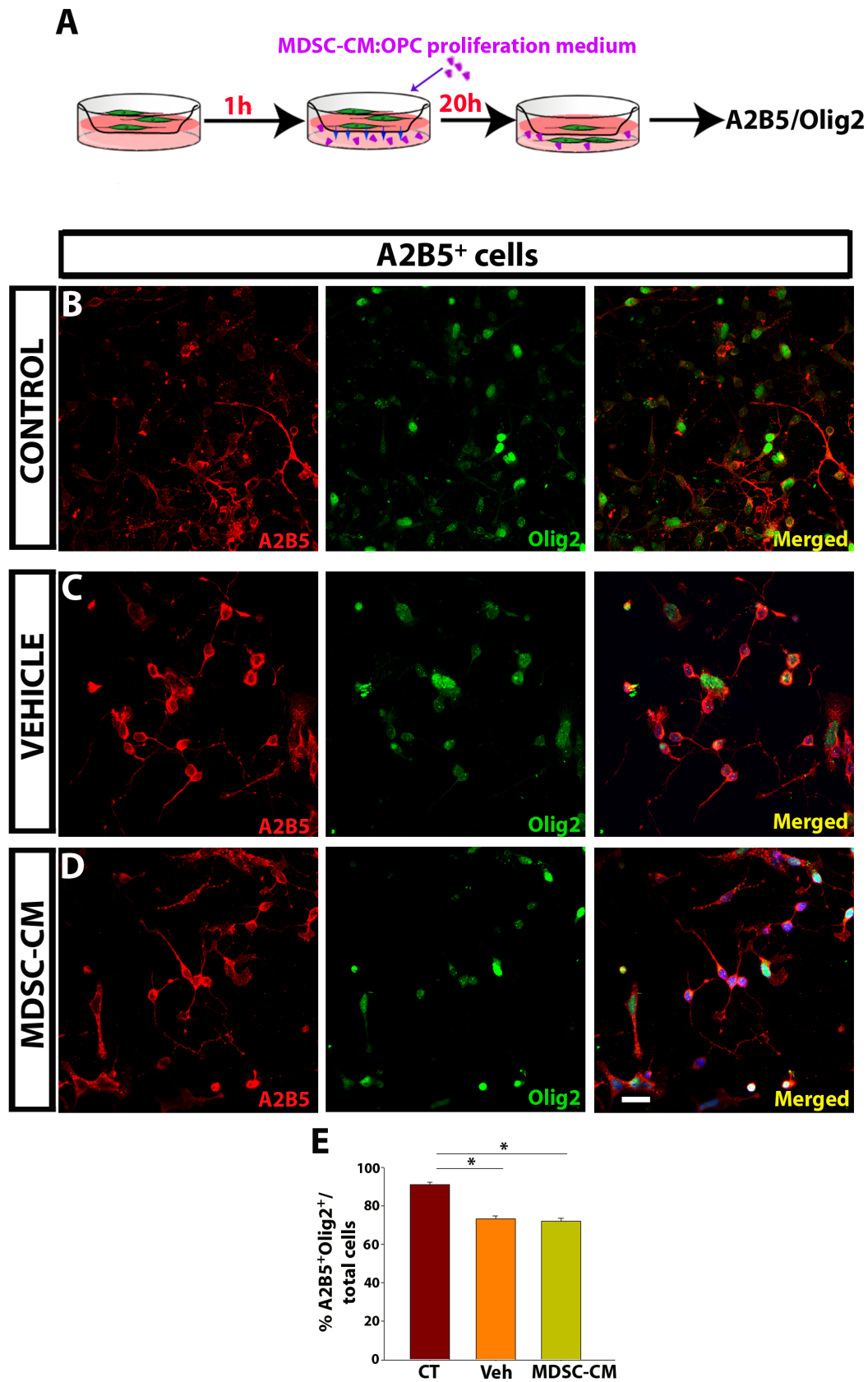


Figura 40. La migración de los OPCs no se ve afectada por la presencia del sobrenadante de MDSCs. A: Esquema del protocolo aplicado para el estudio de la migración de OPCs. B-C: Imágenes representativas de células A2B5⁺ migradas a la cara inferior de la cámara quimiotáctica, en la que aparecen marcadas con Olig2 (verde) y A2B5 (rojo). C: Histograma en el que se muestra disminución significativa encontrada en la migración de los OPCs en presencia de medio condicionado de MDSCs y de su vehículo frente a la condición control.

Figura 40 (continuación). La barra de escala representa 25 μm . El análisis estadístico se realizó utilizando el test ANOVA de una vía para la comparación entre condiciones junto con el test de Dunn para comparaciones múltiples, para cuatro experimentos independientes.

◇ 3.1.4 Los factores solubles de las MDSCs aumentan la diferenciación de OPCs a oligodendrocitos mielinizantes

Tras haber demostrado un efecto positivo de los factores solubles de las MDSCs sobre la supervivencia y la proliferación de los OPCs, se quiso estudiar la maduración de los precursores hacia fenotipos productores de mielina en presencia del medio condicionado de MDSCs. Por esta razón se diseñó un paradigma para el análisis de la diferenciación de células A2B5⁺ aisladas de cortezas de cerebro de ratón neonatal en cultivo con el medio condicionado de las MDSCs durante 6 días de cultivo (Figura 34 A). En este caso, el medio de proliferación de OPCs utilizado en los tres paradigmas anteriores se reemplazó a las 24 horas por un medio de diferenciación, con la misma composición de base pero sin los factores de crecimiento PDGF-AA y bFGF. La diferenciación de los oligodendrocitos se demostró mediante la inmunotinción con dos marcadores de madurez, la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (CNPasa) y la proteína básica de mielina (MBP); junto con el marcador de linaje oligodendroglial, Olig2. Se analizó la expresión de la proteína básica de mielina (MBP), marcador clásico de oligodendrocitos mielinizantes y uno de los componentes principales de las vainas de mielina (figura 34 B-D). Con este análisis se pudo ver que las MDSCs inducían un mayor grado de diferenciación de los OPCs en comparación tanto con el control

como con la condición vehículo, medida como el área ocupada por MBP por campo (Figura 34 E).

3.2 Efecto de las MDSCs sobre el proceso de mielinización

Los efectos de las MDSCs sobre la biología de los OPCs, con una promoción tanto de su supervivencia como de su proliferación y diferenciación, descritos en los apartados anteriores llevan a la conclusión de una promoción de los OPCs hacia una función regeneradora. Sin embargo, para demostrar la efectiva regeneración de la mielina, supervivencia como de su proliferación y diferenciación, descritos en los apartados anteriores llevan a la conclusión de una promoción de los OPCs hacia una función regeneradora. Sin embargo, para demostrar la efectiva regeneración de la mielina, utilizamos cultivos organotípicos ex vivo de cerebelo de ratones neonatales, técnica estándar para el estudio de la producción de mielina y recubrimiento de axones (de la Fuente et al., 2017; Yuen et al., 2013; Zhang et al., 2011). Además, para estudiar un efecto directo de las MDSCs sobre los OPCs y oligodendrocitos distinto de modulación de las células del sistema inmune se lesionó el tejido utilizando una toxina (lisofosfatidil-colina o lisolecitina, LPC por sus siglas en inglés), intercalante de membranas.



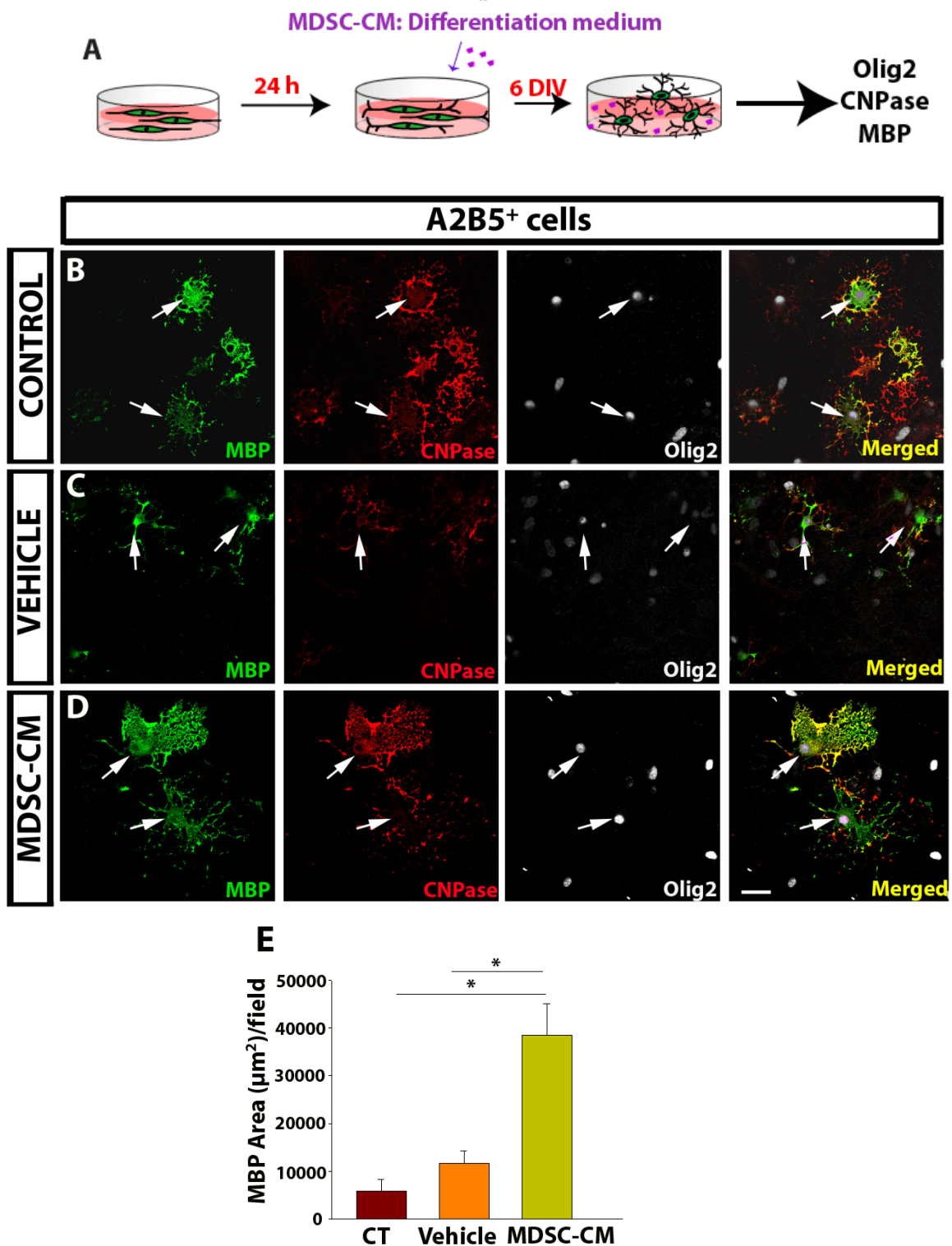


Figura 41. La diferenciación de los OPCs es potenciada en presencia del medio condicionado de las MDSCs A: Esquema del protocolo de diferenciación. B-D: Imágenes representativas del cultivo celular de los OPCs aislados con A2B5 tras 6 días en cultivo en las diferentes condiciones de cultivo, marcadas con MBP en verde, CNPase en rojo y Olig2 en blanco. E: Histograma que muestra un aumento significativo del área cubierta por MBP en presencia de MDSC-MC comparada con las condiciones control y vehículo. Las flechas señalan células doblemente marcadas (MBP⁺Olig2⁺). La barra de escala representa 25 μm. El análisis estadístico se realizó utilizando el test ANOVA de una vía para tres experimentos independientes, seguido del test de Tukey para comparaciones múltiples, donde *p< 0,05, **p< 0,01 y ***p< 0,001.

Este tipo de lesión conlleva una leve inducción de la microglía residente, y puesto que se trata de un cultivo *ex vivo*, no involucra la infiltración de células del sistema inmune. Además, para evitar la interferencia e la reacción de la microglía residente a la lesión producida durante el procedimiento, se estableció un tiempo de 7 DIV para la recuperación al estado basal.

El análisis del porcentaje de remielinización se llevó a cabo en dos momentos temporales: a 4 y a 8 días post-lesión (“dpl”), siempre utilizando rodajas de cerebelo sin lesionar como control interno de cada experimento, que se correspondían con 11 y 15 in vitro (DIV), respectivamente (Figura 42A).

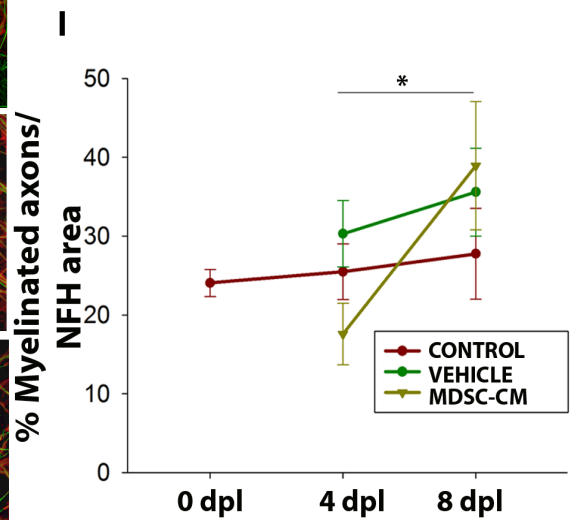
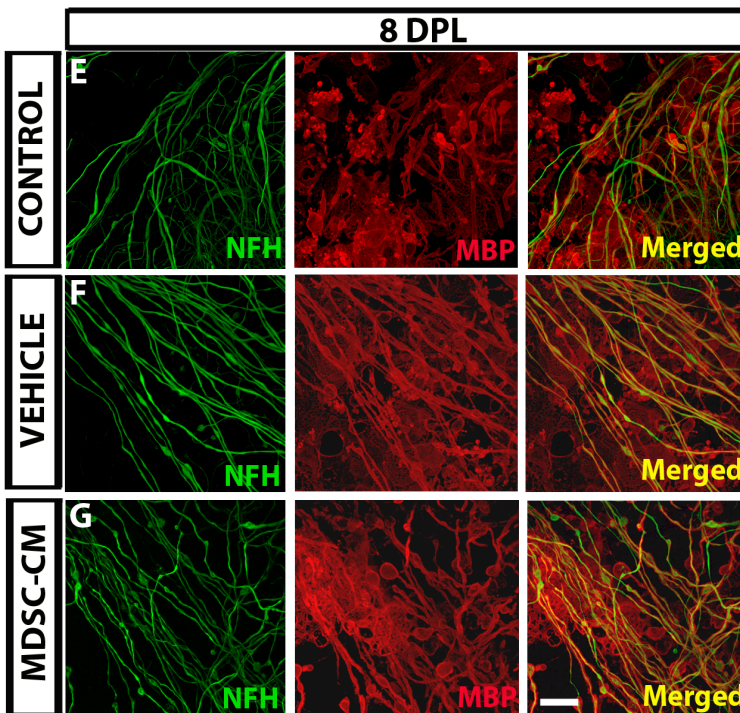
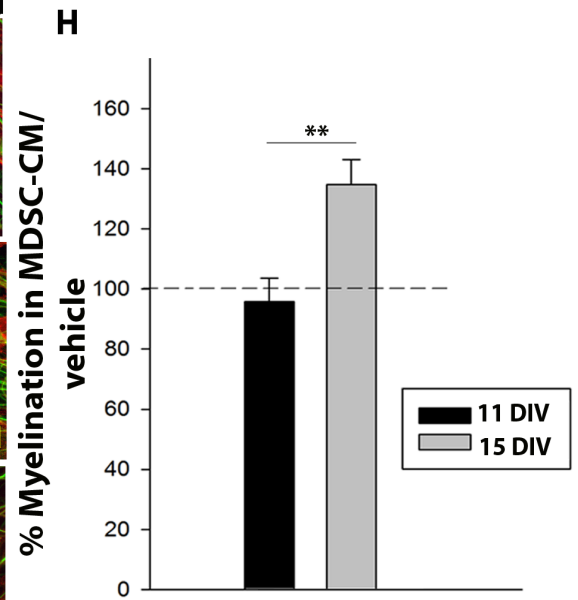
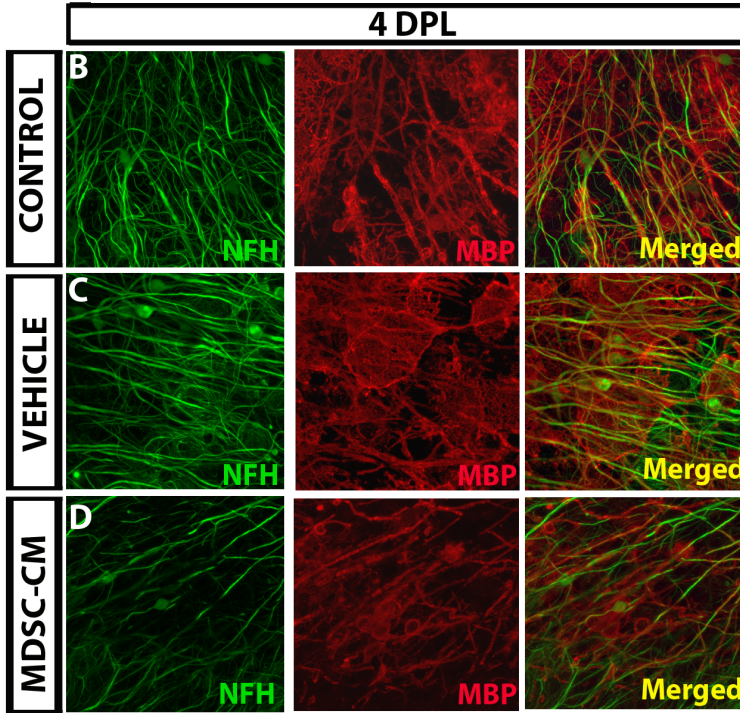
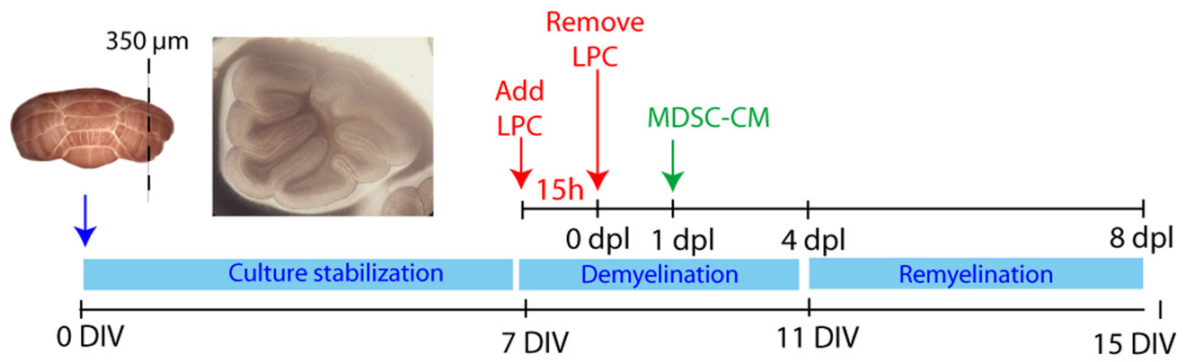
De la observación del tejido no lesionado se pudo concluir que, mientras a 11 DIV no existían diferencias entre las tres condiciones (control, vehículo y medio condicionado de MDSCs; datos no mostrados), a 15 DIV se observó un incremento de la mielinización en presencia del medio condicionado de las MDSCs normalizado respecto al vehículo (vehículo= $36,232 \pm 1,835$; MDSC-CM= $41,692 \pm 2,902$; $p= 0,135$), siendo además este incremento significativo respecto al porcentaje de mielinización a 11 DIV (vehículo= $95,889 \pm 7,68$; MDSC-CM= $134,735 \pm 8,275$; $p= 0,002$; figura 42H).

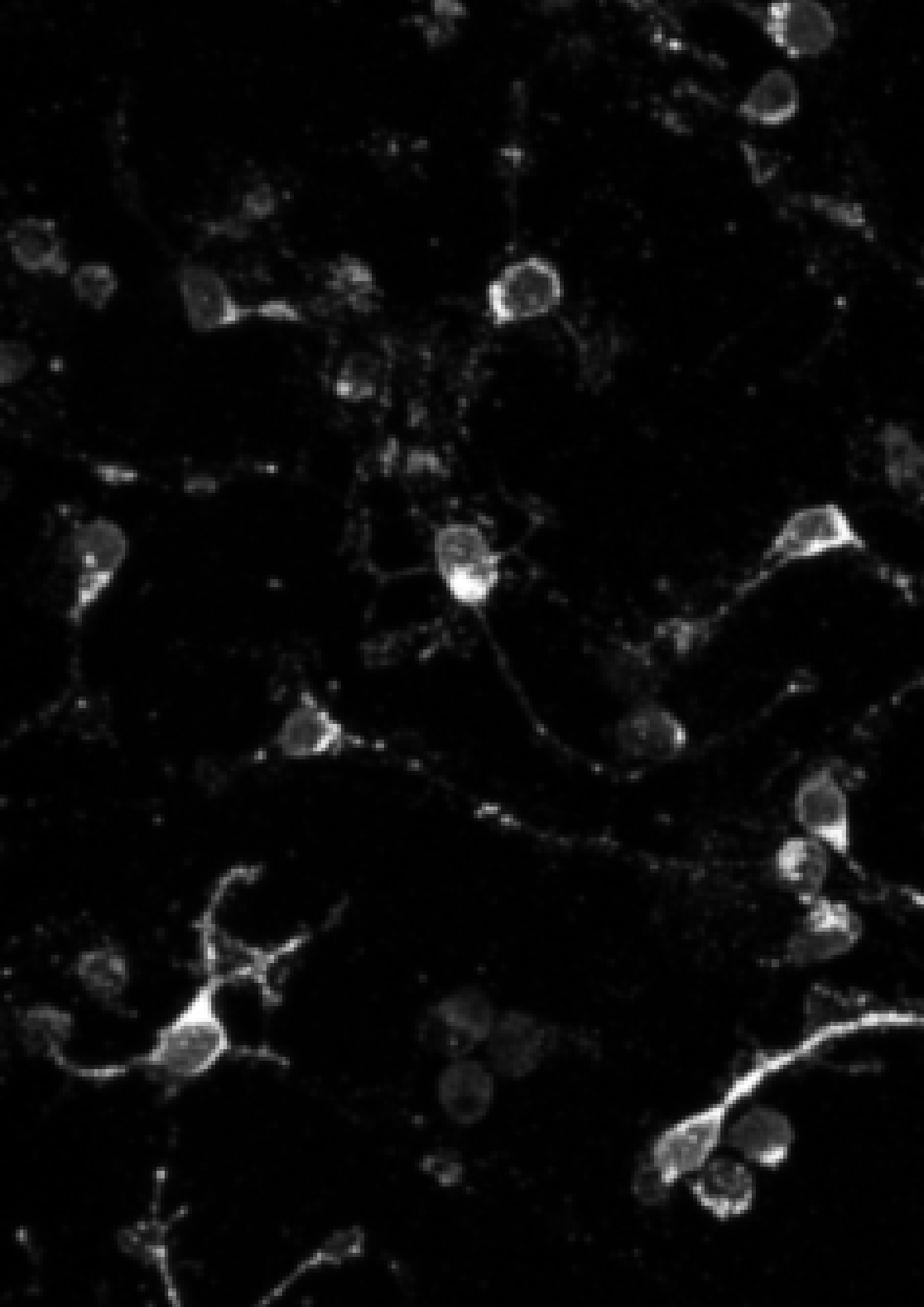
Encuanto al tejido lesionado, la primera observación que se deriva es que el porcentaje de colocación NFH/MBP en la condición control no aumenta lo suficiente como para suponer una completa remielinización a 8 dpl. La segunda conclusión que se deriva es que a 4 dpl la presencia del medio condicionado de MDSCs provoca una menor proporción de axones mielinizados en comparación con el control y el vehículo, siendo significativa la diferencia con éste último (vehículo= $30,31 \pm 4,198$; MDSC-CM= $17,578 \pm 3,902$; $p= 0,042$; figura 42B-D; I). Sin embargo, el nivel de mielinización en la condición MDSC-CM aumenta de forma abrupta y significativa a 8 dpl hasta alcanzar la condición vehículo, siendo superior al control y al vehículo, aunque sin llegar a ser una diferencia significativa (Figura 42E-G; I).

Los resultados obtenidos en este apartado aportan nuevos datos sobre los efectos de las MDSCs en la biología de los OPCs, y su posible implicación en procesos de regeneración de la mielina.

Figura 42 (en página siguiente). El medio condicionado de MDSCs promueve la remielinización *ex vivo*. A: Procedimiento experimental para el cultivo organotípico de rodajas de cerebelo. B-G: Imágenes representativas de los cultivos organotípicos lesionados con lisolecitina a 4 dpl (B-D) y 8 dpl (E-G), mostrando la colocación de la mielina (MBP, rojo) con axones (NFH, verde) en condiciones control (B; E), vehículo (C; F) y en presencia de MDSC-MC (D; G). H: Gráfico en el que se representa el incremento en el porcentaje de mielinización (área de colocación NFH/MBP respecto al área de NFH) de las rodajas de la condición MDSC-CM respecto al vehículo, en rodajas no lesionadas. I: Gráfico en el que se muestra el porcentaje de remielinización a lo largo del cultivo. La barra de escala representa 25 μm .









Discusión

La esclerosis múltiple es la enfermedad neurodegenerativa más común en adultos jóvenes del mundo desarrollado y la segunda en causar disfunción neurológica en adultos. Junto al desconocimiento de la etiología, se une el hecho de que aún una patología propia del SNC (muerte de oligodendrocitos, desmielinización y daño axonal) con aquella procedente de la autorreactividad del sistema inmune, lo que desemboca en una gran variedad de síntomas y variantes clínicas. Todo esto la convierte en una enfermedad de difícil abordaje, si bien es verdad que en las últimas décadas se han llevado a cabo grandes avances tanto en su diagnóstico como en su tratamiento. Sin embargo, y a pesar de la inmensa cantidad de nuevos fármacos disponibles modificadores de la enfermedad, no existe un tratamiento integrador y efectivo que limite la respuesta inmune (inmunomodulador) a la vez que proteja el sistema nervioso y repare las lesiones ya producidas (neuroprotector/regenerador/remielinizante). Es más, hasta este mismo año no existían evidencias clínicas de ningún tratamiento frente a la variante más agresiva de la enfermedad, la primaria-progresiva (Montalban et al., 2017). De la misma forma, la comunidad científica y médica se encuentra en una búsqueda activa de marcas genéticas e hitos identificadores de la enfermedad en sus estadios más tempranos, que permitan una detección precoz y un tratamiento personalizado y adecuado a la evolución prevista de cada paciente y a su grado de respuesta al tratamiento.

Nuestro grupo lleva varios años siguiendo una línea de trabajo centrada en el papel de las MDSCs en EM. Aunque estudiadas en diferentes patologías,

la mayor parte de la literatura científica proviene del estudio de su fenotipo y actividad ligados al ambiente tumoral. El descubrimiento de su presencia y actividad en enfermedades autoinmunes (Moliné-Velázquez et al., 2016), y más concretamente, en aquellas que afectan al SNC, abrió las puertas para el descubrimiento de nuevos mecanismos de control inflamatorio en contextos no tumorales. Utilizando el modelo animal más utilizado para el estudio de la EM, la EAE, los trabajos de investigación publicados por nuestro grupo (Moliné-Velázquez et al., 2011; Moliné-Velázquez et al., 2014) describieron el paralelismo existente entre la presencia de las MDSCs y la evolución clínica de la enfermedad, así como las consecuencias clínicas de su modulación farmacológica. Sin embargo, se desconoce los efectos que los fármacos actuales para EM tienen sobre esta población celular. Por otra parte, hasta el momento no se ha descrito la contribución que las MDSCs puedan tener sobre la aparición, desarrollo y severidad de la enfermedad; ni si participan no sólo en la limitación de la respuesta inmune generando un ambiente antiinflamatorio sino en la promoción de la protección y reparación del tejido nervioso. Este último aspecto se encuentra íntimamente relacionado con la llegada y maduración de las células responsables de la regeneración del tejido, y principales afectadas negativamente por la exacerbación de la respuesta inmune, los oligodendrocitos, en todo su linaje desde precursores hasta células mielinizantes. Este trabajo ha pretendido el estudio de las MDSCs en un contexto de autoinmunidad del sistema nervioso, atendiendo a todos estos aspectos aún no descritos en la literatura.

Uso del IFN- β como tratamiento modulador de las MDSCs

En primer lugar, en este trabajo se propone por primera vez que algunos de los efectos beneficiosos del tratamiento de primera línea para EM, el IFN- β , son al menos parcialmente mediados por las MDSCs, estudiados en el contexto de la EAE, y cómo recíprocamente estas células pueden ser moduladas por esta citoquina, tanto *in vivo* como *in vitro*. Como ya se ha visto en otras ocasiones, se el tratamiento con IFN- β (a la dosis descrita en la literatura; Cheng et al., 2015; Galligan et al., 2010; Zhao et al., 2018) mejora el curso clínico de la enfermedad. Sin embargo, hasta ahora no se había demostrado que una única inyección, a la misma dosis, al principio de los síntomas mejorara de forma significativa el curso clínico de la enfermedad, lo que en este trabajo se relaciona de forma novedosa con la presencia de MDSCs tanto en el bazo como en zonas infiltradas de la médula espinal. Es más, las MDSCs aisladas de ratones a los que se les induce la EAE y tratados con IFN- β exhiben un fenotipo inmunosupresor potenciado, lo que se une a la observación de una mayor densidad de linfocitos T apoptóticos en el parénquima nervioso, principal diana de las MDSCs (Moliné-Velázquez et al., 2011; Zhu et al., 2007). Nuestros estudios *in vitro* demuestran, además, que el tratamiento de las MDSCs con IFN- β potencia directamente la inmunosupresión que éstas ejercen sobre los linfocitos T activados, probablemente debido a la preservación del estado de inmadurez de las MDSCs, hecho que se ha demostrado de vital importancia para su función (Moliné-Velázquez et al., 2014).

Ya se ha demostrado previamente que el IFN- β mejora la variante EM-RR retrasando la aparición de un nuevo episodio sintomático, disminuyendo la severidad de éste y/o controlando la respuesta proliferativa mediada por las APCs (Arnason, 2005; Jankovic, 2010). Sin embargo, nuestros datos muestran, además, la potenciación de la inmunosupresión de linfocitos T mediada por las MDSCs, mecanismo que se podría considerar también responsable al menos en parte de esa mejoría (Kieseier, 2011). A este respecto, se sabe que distintas poblaciones de células mieloides infiltradas en el SNC pueden responder a IFN- β en EAE: éste es el caso de macrófagos y células dendríticas derivadas de sangre y médula ósea (Wlodarczyk et al., 2015). El presente trabajo muestra una mayor expresión en las MDSCs de una de las subunidades del receptor de IFN- β , IFNAR1, en comparación con la población de células mieloides en general o la de neutrófilos, e incluso mayor que la de las células T, el tipo celular del sistema inmune con mayor expresión de este receptor (Kavrochorianou et al., 2016). Diferentes tipos celulares han sido analizados para desentrañar la diana celular del IFN- β durante la fase efectora de la EAE, incluyendo células residentes del SNC, linfocitos y células mieloides (Prinz et al., 2008). Esta última población parece ser determinante en la progresión de la EAE, especialmente los IMos con fenotipo CD11b⁺Ly-6C⁺ y características de IMCs. Además, el IFN- β disminuye la capacidad presentadora de antígeno de la microglía y promueve el viraje de M1 a M2 de esta población (Tarassishin et al., 2011). Todos estos datos apuntan a las células mieloides que expresan IFNAR como

una de las principales dianas del IFN- β durante la desmielinización mediada por autoinmunidad. Sin embargo, no podemos descartar que parte del efecto observado en la mejora sintomatológica sea mediada por los efectos del IFN- β sobre la población linfocitaria, puesto que se ha visto una mejora de la EAE tras el tratamiento con IFN- β sólo en el caso de ser una respuesta mediada por Th1, mientras que empeora en el caso de una respuesta Th17, de forma dependiente a la señalización por IFN- γ (Axtell et al., 2010).

Aunque se han demostrado diferentes papeles directos del IFN- β sobre la biología de las células T tanto en EAE (Galligan et al., 2010; Teige et al., 2006; Trinschek et al., 2015) como EM (Rudick et al., 1993), los datos que se aportan en este trabajo proponen, por primera vez, que la promoción de la muerte y apoptosis de los linfocitos T como consecuencia del tratamiento con IFN- β puede estar directamente debida a la mejora de la actividad de inmunosupresión de las MDSCs. A este respecto, se ha descubierto recientemente que la terapia con IFN- β en pacientes de EM regula la respuesta de la inmunosupresión ejercida por los linfocitos Tregs sobre las células T activadas, los cuales son inducidos por las MDSCs en diferentes escenarios inflamatorios con componente autoinmune del SNC, y el cual podría ser un mecanismo compartido por las MDSCs (Trinschek et al., 2015) (Melero-Jerez et al., 2016). Es más, se ha demostrado la importancia del IFN- β para la promoción de la actividad supresora mediada por NO de las IMCs con fenotipo CD31⁺CD11b⁺Ly-6C⁺Ly-6G⁺ aisladas de médula ósea (Campillo et al., 2006), mecanismo supresor compartido por las MDSCs (Melero-Jerez et al., 2016; Moliné-Velázquez et al., 2016).

Por otra parte, nosotros detectamos que la inyección única de IFN- β en el modelo de EAE induce la acumulación de MDSCs en el bazo y potencia su fenotipo inmunosupresor, lo que concuerda con lo observado por Taleb y colaboradores en un modelo murino de infección viral crónica; (Taleb et al., 2017). Ambos efectos podrían ser el resultado de i) la acción directa del IFN- β sobre las MDSCs; o ii) la consecuencia de una modulación más general del ambiente inflamatorio hacia respuestas anti-inflamatorias (Galligan et al., 2010; Trinschek et al., 2015). En el caso de que se debiera a un efecto directo, el tratamiento con IFN- β podría ejercer una función en varios aspectos de la biología de las MDSCs. Uno de los aspectos más importante para su función inmunosupresora deriva del bloqueo de su diferenciación hacia fenotipos maduros, maduración que normalmente ocurre tras la activación clásica durante episodios de inflamación aguda (Ribechini et al., 2010; Veglia et al., 2018; Youn et al., 2012). Respecto a la diferenciación celular, nuestro trabajo apunta al IFN- β como tratamiento preventivo para la maduración de las MDSCs, al menos hacia un fenotipo claramente macrofágico. Aunque el mecanismo está aún por revelar, podría estar relacionada con el anclaje del IFN- β a su receptor en la membrana, ya que el efecto encontrado para la expresión de F4/80 es totalmente dependiente de la presencia de la citoquina. Además, en este trabajo mostramos un enriquecimiento de las MDSCs, caracterizadas como CD11b⁺Arg-1⁺, dentro del compartimento mieloide de las células infiltradas en el SNC tras el tratamiento con IFN- β . Como ya se describió en trabajos anteriores (Moliné-Velázquez

et al., 2011), la mayoría de las células Arg-I⁺ dentro de las lesiones de médula espinal de ratones EAE en el pico expresan CD11b y Gr-1, coexpresión propia de las MDSCs, junto con un porcentaje de expresión de MHC-II de menos del 10 %, lo que excluye en gran parte la posibilidad de que se trate de macrófagos y/o microglía, aunque no lo descartamos (Moliné-Velázquez et al., 2011; Moliné-Velázquez et al., 2014). Además, la contribución de la microglía residente frente a los monocitos/macrófagos infiltrados parece residual respecto a la evolución y severidad de la EAE (Ajami et al., 2011). Sin embargo, aún queda trabajo por hacer para distinguir fenotípicamente unas poblaciones tan parecidas como son los macrófagos, monocitos, células derivadas de monocitos y microglía en el ambiente inflamatorio de las lesiones del SNC (para una revisión, ver Greter et al., 2015; Moline-Velazquez et al., 2016; Yamasaki et al., 2014). En el presente trabajo, se encontró que las CD11b⁺Arg-1⁺ forman parte de unas lesiones más pequeñas y con mayor concentración celular en comparación con los ratones tratados con vehículo. Esta observación puede ser debida a un aumento en la capacidad de migración/movilización de las MDSCs hacia las zonas con una respuesta inflamatoria activa. A este respecto, Ly-6C es un antígeno de membrana útil para distinguir subpoblaciones de monocitos de la sangre de ratón atendiendo a su estadio de maduración y a su capacidad migratoria hacia los sitios inflamatorios: Ly-6C se expresa de forma mínima en condiciones normales pero se incrementa tras varios insultos inflamatorios (Sunderkotter et al., 2004; Udalova et al., 2016). Respecto a la

migración, el alto nivel de expresión de esta molécula en los monocitos está relacionada con la capacidad de migración de los IMos Ly-6C^{high} (Saederup et al., 2010). Estas células expresan CCR2 (Serbina and Pamer, 2006), un receptor de quimiocinas -cuyo ligando es CCL2- y que se encuentra ausente en el caso de los monocitos Ly-6C^{low} (monocitos maduros o residentes), y estrechamente relacionado con la capacidad de infiltración a través de la BHE en EAE (Mildner et al., 2009; Saederup et al., 2010). Aunque la función de Ly-6C en los monocitos no se comprende en su totalidad, se ha visto que su bloqueo está relacionado con una disminución de la infiltración de monocitos en un modelo murino de esclerosis lateral amiotrófica (Butovsky et al., 2012), así como en modelos de patologías autoinmunes como la artritis reumatoide (Udalova et al., 2016). En este último caso, se demuestra que más del 90% de los monocitos infiltrados son Ly6-C^{high}, reclutados a través de CCL2, siendo la mayor fuente de IMos en la fase inicial del episodio. Como demostramos en nuestros estudios *in vitro* en este trabajo, la expresión de Ly-6C se potencia en presencia de IFN- β y su efecto es permanente al menos tras 72 horas en cultivo. De esta forma, la mayor intensidad de fluorescencia de Ly-6C encontrada tras el tratamiento con IFN- β puede indicar una mayor habilidad pro-infiltración para invadir el SNC durante la EAE. Curiosamente, se ha sugerido que, al menos en linfocitos T, la expresión del gen *Ly-6c* es positivamente regulado por el IFN- β debido a la presencia de elementos de respuesta a IFN en su promotor (Dumont et al., 1986).

Es más, la capacidad inmunosupresora de las MDSCs se encuentra inversamente relacionada con

el grado de maduración (Moliné-Velázquez et al., 2014) y directamente con el nivel de Ly-6C (Zhu et al., 2007), lo que podría estar mediado por el factor de diferenciación mieloide MyD88, ya que su inhibición previene la diferenciación de células mieloides y mejora la progresión de la EAE (Dishon et al., 2017). A este respecto, la relación de los factores reguladores de la respuesta a interferón (IRFs, *interferón regulatory factors*, en inglés) con la maduración de las células mieloides es un campo en actual evolución (Honda et al., 2006). Por una parte, varios estudios demuestran que el factor IRF8 (*Interferon Response Factor 8*, en inglés) es determinante para la expansión de los precursores comunes de granulocitos y monocitos (CGMP, *common granulocyte/monocyte progenitor*, en inglés), impide la diferenciación terminal de los granulocitos y la activación de los monocitos y previene la diferenciación de estos hacia macrófagos y células dendríticas, lo que revierte en la acumulación de MDSCs con fenotipo CD11b⁺Gr-1⁺ (Scheller et al., 1999; Sonda et al., 2011; Stewart et al., 2009). Por otra parte, la inducción de otras poblaciones reguladoras, como es el caso de la variante no convencional de células dendríticas, las pDCs (del inglés, *plasmacytoid dendritic cells*) por el IFN de tipo I, y la asociación de IRF7 y a MyD88 apoya la idea de que el IFN de tipo I pueda estar relacionado con la maduración de las células de linaje mieloide, como las MDSCs (Honda et al., 2006).

Estos datos llevan a pensar en una posible regulación de maduración y migración de las células Ly-6C^{high} por parte del IFN-β. Sin embargo, es necesario tener en cuenta la acción dual del Ly-6C, puesto que existen estudios previos en los que se

demuestra la función tanto pro-inflamatoria como anti-inflamatoria y reparadora de los monocitos en función de su expresión de Ly-6C (Hilgendorf et al., 2014); así como la ya demostrada plasticidad de las células CD11b⁺Ly-6C^{high}Ly-6C^{-/low} en el modelo de EAE (Zhu et al., 2011). En este trabajo se propone que, mientras que la función del IFN-β sobre las células extraídas en el pico y cultivadas podría ser impedir su maduración a través de la preservación de Ly-6C, es posible que en el caso del debut de la EAE, donde estas mismas células se ha descrito que ejercen una función pro-inflamatoria y de presentación antigénica (King et al., 2009; Mildner et al., 2009), se acelere su viraje a fenotipos anti-inflamatorios, conservando su status de inmadurez pero además favoreciendo su función inmunosupresora. Este viraje se vería favorecido además por la generación de un ambiente anti-inflamatorio general provocado por las acciones antes descritas del IFN-β (Galligan et al., 2010).

Nuestro estudio confirma que la modificación en la densidad de MDSCs de la médula espinal, en este caso producida por el tratamiento con IFN-β, es paralela a un mayor porcentaje de linfocitos T en apoptosis (Moliné-Velázquez et al., 2011). En el mismo sentido, esta observación cualitativa encontrada en el parénquima nervioso fue corroborada *in vitro*, comprobando la habilidad inmunosupresora de las MDSCs aisladas de ratones EAE tratados con IFN-β o vehículo. Para apoyar este modelo, se muestra un descenso semicuantitativo en la inmunofluorescencia de Gr-1 y un aumento en el caso de CD124 (IL-4Rα), lo que se ha descrito en la literatura como un signo de mayor efectividad



en la promoción de apoptosis de los linfocitos T en EAE (Moliné-Velázquez et al., 2014; Zhu et al., 2007) y cáncer (Gallina et al., 2006; Mandruzzato et al., 2009). De hecho, las células CD124⁺ se ha demostrado que son cruciales en otros aspectos de un ambiente anti-inflamatorio y reparador del tejido, como por ejemplo la inducción de los procesos de como inductores de remielinización, reforzando la idea de un papel pro-regenerativo de IL-4Rα en las células mieloides (Psachoulia et al., 2016).

Nuestros resultados aportan datos sobre la promoción de la actividad inmunosupresora de las MDSCs inducida de forma directa por el IFN-β. Como se menciona anteriormente, se ha descrito que el IFN-β producido por APCs del SNC (principalmente microglía, pero también astrocitos; Gimsa et al., 2013) participa en la supresión de la proliferación de células Th1 (Teige et al., 2006), previniendo su proliferación pero sin disminuir su viabilidad. Sin embargo, aquí se demuestra no sólo una disminución en el número de células proliferantes sino además un incremento en la fase subG1 (células apoptóticas), algo demostrado anteriormente por nuestro grupo con el cocultivo de MDSCs aisladas de médula espinal de ratones EAE y linfocitos T (Moliné-Velázquez et al., 2011). Por otro lado, los datos *in vitro* que aquí presentamos añaden un nuevo enfoque al efecto del ambiente inflamatorio en el cual las MDSCs desarrollan su actividad inmunosupresora. De nuestros resultados se extrae la conclusión de que la presencia de los linfocitos T activados estimula por sí misma las propiedades anti-inflamatorias de las MDSCs, hecho atribuido por Zhu y colaboradores a la producción de IFN-γ por parte de los linfocitos T activados, y detiene su

maduración hacia fenotipos pro-inflamatorios, lo que podría ser una manifestación de retorno a la homeostasis y limitación autorregulada de la respuesta inflamatoria (Zhu et al., 2011). Es más, esta interacción fisiológica se ve potenciada por el tratamiento con IFN-β. Por estas razones, se puede considerar a las MDSCs un novedosa diana celular directa para los efectos del IFN-β en EAE. .

Es necesaria más investigación para determinar el fenotipo exacto de las MDSCs y su participación en el control de la respuesta inmune en el escenario real de la EM (Melero-Jerez et al., 2016). A día de hoy sólo se conoce el efecto de uno de los DMT, el acetato de glatirámico (GA, *glatiramer acetate*, en inglés) sobre esta población celular, en concreto sobre la subpoblación de M-MDSCs, cuyo porcentaje se ve incrementado de forma moderada en la circulación de pacientes de EM-RR tratados con acetato de glatirámico comparado con pacientes sin tratar (Cantoni et al., 2017).

Las MDSCs como marcador terapéutico de severidad de la enfermedad

La EM presenta una amplia variedad de evoluciones clínicas, agrupadas por razones clínicas en variantes remitentes-recurrentes y variantes progresivas (de mayor o menor actividad), pero tan heterogénea como lo es la población de pacientes. Es por ello que, de cara tanto a un mejor diagnóstico como a la elección de la terapia adecuada, es necesario avanzar en el conocimiento de los factores que determinan la evolución clínica de cada paciente, una vez iniciada la enfermedad, así como del establecimiento de

biomarcadores. A este respecto, un biomarcador se definiría como aquella característica que puede ser medida de forma objetiva, de fácil acceso y bajo coste, que se correlacione con algún proceso biológico normal o patológico y que sea de alta sensibilidad y especificidad (Paul et al., 2018).

La estandarización propia de un modelo animal como la EAE, la uniformidad en el origen de los individuos, la edad y el sexo, así como la estabulación, permite reducir los factores disturbadores que puedan generar variabilidad en la muestra. Aun así, entre las posibles causas de esta variabilidad podemos encontrar características hormonales (como por ejemplo el momento estral; Hoffner et al., 2006; Lelu et al., 2011; McClain et al., 2007) y de microbiota (Colpitts et al., 2017; Wilck et al., 2017), intrínsecas al individuo. En este trabajo se ha observado que la composición de las poblaciones mieloides se enriquece en MDSCs en periferia en el pico de máxima afectación, pero más trabajo es necesario para saber si se trata de una causa o consecuencia de esta variabilidad y servir como indicador de daño a nivel del SNC.

Así, en este trabajo se presentan datos novedosos sobre la participación de las MDSCs en la evolución de la EAE. El contenido esplénico de las MDSCs está inversamente relacionado con la agresividad del curso clínico, así como directamente relacionado con marcas histopatológicas de daño tisular del SNC, a saber, mayor apoptosis de linfocitos T, menor desmielinización y menor daño axonal.

A este respecto, es importante establecer un criterio universal para definir el concepto de “agresividad” de la enfermedad, así como

estandarizar las herramientas para su medición. A día de hoy existen varias escalas para medir la evolución de los pacientes, siendo la EDSS la más usada. La introducción del factor “duración de la enfermedad” con la aparición de la escala MSSS supuso una mejora importante, extendiéndose su uso en clínica y permitiendo una mejor elección del DMT. Sin embargo, la complejidad de un diagnóstico como el de la EM presenta la dificultad añadida de establecer de forma certera el momento de inicio de la enfermedad (ya que generalmente se asigna de forma retrospectiva), y por lo tanto, calcular su duración. En este trabajo, el uso de un modelo animal estandarizado como el de la EAE permite establecer con exactitud el debut de la enfermedad debido a su inmediato reflejo en la sintomatología clínica. Este hecho ha permitido definir un nuevo parámetro, en índice de agresividad (AI), que recoge tanto la puntuación máxima alcanzada como la duración de la enfermedad, y que se podría asemejar al MSSS del ámbito clínico. Otras escalas aparecidas en los últimos años normalizan la EDSS en función de la edad a la que se evalúa al paciente (ARMSS) o la pérdida de peso (CombiWISE; Manouchehrinia et al., 2017; Kosa et al., 2016). Aplicándolos al estudio en la EAE, el primero carecería de utilidad puesto que todos los ratones tienen la misma edad, pero en nuestro trabajo sí utilizamos el segundo como parámetro indicador de agresividad de la enfermedad. En un estudio llevado a cabo recientemente por Kalinchink y colaboradores se realizó un análisis multiparamétrico utilizando una cohorte global y llegando a la conclusión de que los elementos que más influían en la evolución de la enfermedad

eran la edad, duración de la enfermedad, curso de la enfermedad, actividad previa de las recaídas, grado de discapacidad, fenotipo predominante durante cada recaída y terapia previa (Kalincik et al., 2017).

Por otra parte, la dificultad de poder monitorizar la progresión de las lesiones de EM, junto con la variedad de mecanismos subyacentes y la complejidad que supone muestrear directamente el tejido lesionado del SNC ha enlentecido el desarrollo de biomarcadores de las fases progresivas de la EM. A día de hoy, se usan distintos marcadores, que incluyen: marcas histopatológicas (lesiones con MRI) y genéticas, niveles de citoquinas, daño tisular, presencia de anticuerpos en suero (bandas oligoclonales) y porcentaje de poblaciones celulares; siendo el MRI la técnica más relevante y usada para el diagnóstico y pronóstico, y la única capaz de interrogar el SNC in vivo de forma completa y directa. Así, la MRI se utiliza como criterio diagnóstico y predictivo de la evolución de la enfermedad y de respuesta a tratamientos, puesto que las lesiones nuevas observadas con MRI son un orden de magnitud más frecuente que un brote de síntomas (Rovira et al., 2015). A este respecto, es importante destacar el impacto que la MRI tiene en la detección de casos de síndrome radiológico aislado (RIS, radiologically isolated syndrome, en inglés), de los cuales más de un 50 % acaban desarrollando la enfermedad (Kantarci et al., 2016). A la mejora de la MRI que supone la introducción de la MRI de 7 tesla, se han añadido recientemente otras herramientas de medida de la evolución de la EM, como la tomografía por emisión de positrones y la tomografía por coherencia óptica (Saidha et al., 2015). Por otra parte, el uso de marcadores en fluidos como el LCR

o la sangre está aún en estudio. A día de hoy, la presencia de anticuerpos en el LCR y su reflejo en byas oligoclonales específicas se han utilizado como factor diagnóstico; de hecho, la presencia de folículos ectópicos de linfocitos B de meninges ha sido asociada con mayor severidad de la EM (en cuanto a aparición más temprana de los síntomas y mayor discapacidad; Disanto et al., 2012; Mastorodemos et al., 2015). Sin embargo, su uso es limitado puesto que las infecciones pueden generar los mismos patrones. También se está estudiando el uso de pequeños fragmentos de RNA no codificante como marcador de la evolución de la enfermedad (Iparraguirre et al., 2017). El hallazgo de biomarcadores en sangre circulante supondría un gran avance respecto a una técnica tan invasiva como es la extracción de LCR; sin embargo, a día de hoy no existen biomarcadores validados ni de diagnóstico ni de pronóstico. A este respecto, la detección de citoquinas y la presencia y/o abundancia de poblaciones de células inmunes circulantes se convierten en los mejores candidatos.

Atendiendo a la población mieloide, una mayor severidad de la EAE (medida como un aumento en la puntuación máxima alcanzada en la escala de evaluación) se ha relacionado con la infiltración de células derivadas de monocitos con fenotipo $CD45^{hi}CD11b^{+}Ly6G^{-}Ly6C^{+}CD11c^{+}MHC-II^{+}$, macrófagos y células dendríticas, así como con la presencia de microglía activa (De Feo et al., 2017). En el estudio llevado a cabo por Brochet y colaboradores se estudió la utilidad como biomarcador del uso de la técnica USPIO (del inglés *ultra small super paramagnetic iron oxide*) acoplada a MRI como medida de la infiltración de macrófagos en la

lesiones inflamatorias de la EAE. Este parámetro se correlacionaba con la severidad de la EAE (entendida como tal el daño tisular alcanzado en cuanto a nivel de inflamación, desmielinización y daño axonal Brochet et al., 2006), parámetros que se relacionan en el presente trabajo con la presencia periférica de MDSCs. A día de hoy, la función y la ventana temporal que las MDSCs tienen en el SNC durante la EAE sigue siendo controvertida. Zhu y colaboradores vieron que un aumento de Ly-6C^{hi} en el debut de síntomas se relacionaba con una exacerbación de la enfermedad (Zhu et al., 2011). En el pico se ha demostrado su función inmunosupresora), pero también una función contraria (Ioannou et al., 2012). Además, el trasplante de IMCs en el debut de la EAE retrasó la aparición de síntomas y su severidad (Zhu et al., 2011), lo mismo que sucede con el trasplante de G-MDSCs (Ioannou et al., 2012). En este estudio además se demostró la presencia de G-MDSCs en la sangre periférica de pacientes con EM y su actividad supresora de la proliferación de linfocitos T. Sin embargo, el papel que juegan las M-MDSCs en los pacientes de EM está aún por determinar.

Por otra parte, la evidencia de la participación de linfocitos Th1 y Th17 en la patofisiología tanto de la EM como la EAE viene dada tanto por estudios genéticos (International EM Genetics Consortium: Wellcome Trust Case Control Consortium, Nature 2011) como de estudios *in vivo* en los que la alteración de la presencia o actividad de estas poblaciones modifica tanto la aparición como la progresión de EAE (Becher et al., 2002; Hofstetter et al., 2005; Komiyama et al., 2006) y

EM (Brucklacher-Waldert et al., 2009; Durelli et al., 2009; Muls et al., 2012). Por otra parte, el estudio llevado a cabo por Christy y colaboradores estableció la activación de los mastocitos como uno de los primeros eventos iniciadores de la EAE (Christy et al., 2013), junto con la inflamación de las meninges y la infiltración de neutrófilos (Ajami et al., 2011; Christy et al., 2013; Wu et al., 2009), contribuyendo a la destrucción de tejido en la fase aguda de la EAE.

En este trabajo se relaciona la abundancia de las MDSCs periféricas con características histopatológicas del SNC. Como vieron Zhu y colaboradores en bazo, y Moliné-Velázquez y colaboradores en médula, la abundancia de MDSCs es paralela al curso clínico de la EAE, incrementándose conforme aumenta la sintomatología y disminuyendo paulatinamente con la recuperación de síntomas (Moliné-Velázquez et al., 2011; Zhu et al., 2007). Sin embargo, en el primero de los trabajos se observó un retraso de la aparición en el SNC respecto a la periferia, así como una función inmunosupresora de las MDSCs extraídas de bazo. Estos datos apuntan a que la inmunosupresión ejercida por esta población no se lleve a cabo exclusivamente en el parénquima del SNC, sino también en la periferia. De hecho, los estudios de las IMCs infiltradas en el pico de la EAE demuestran una rápida polarización de estas células hacia fenotipos maduros dependiente del ambiente inflamatorio, y a falta de datos sobre la ventana temporal en la cual permanecen en estado inmaduro y con capacidad inmunosupresora potente, cabe pensar en que esta acción se desarrolle de forma preferente en la periferia. Todo esto explicaría el hecho de que una mayor presencia de MDSCs

periféricas en el pico se refleje en una mayor apoptosis de linfocitos T en el SNC, junto con un menor daño tisular, puesto que a la inmunosupresión periférica se le añadiría la ejercida por las IMCs CD11b⁺Ly-6C^{high} que se habrían ido infiltrando paulatinamente durante la fase efectora de la EAE y habrían ejercido la inmunosupresión en el SNC. Otra posible explicación podría provenir del hecho de que ambos compartimentos se comuniquen de forma continua durante la fase efectora de la EAE, de forma que una mayor presencia de MDSCs en el bazo (reflejo de una mayor producción) se traduzca en una mayor infiltración en el SNC.

Las MDSCs como agentes promotores de remielinización

Como se ha descrito en el epígrafe anterior, la asociación entre el porcentaje de MDSCs a nivel periférico con un menor daño tisular en términos de desmielinización y daño axonal podría estar relacionado con un efecto sobre la regeneración y reparación del tejido. Además de su capacidad de influir y modular el ambiente inflamatorio de la lesión tanto a nivel periférico como en el interior de la lesión, nos hemos preguntado si las MDSCs tenían a un efecto regenerador, puesto que está ampliamente demostrado que una de las funciones de la inflamación es la preparación del tejido dañado para su reparación. Por otra parte, como hemos descrito en el apartado de tratamiento con IFN- β , una mayor concentración de MDSCs se correlaciona con un menor grado de inflamación en la propia médula espinal. Por todo lo anterior, nos hemos preguntado si, además

de su potente efecto inmunosupresor, las MDSCs podrían tener un efecto directo sobre los OPCs. La superposición de los procesos de desmielinización –remielinización durante el episodio inflamatorio de la EAE supone el principal inconveniente para estudiar los distintos componentes que contribuyen a la reparación del tejido en este modelo (Franklin and ffrench-Constant, 2017). El estudio de los procesos de mielinización debe atender a dos fases: i) la atracción y activación de los oligodendrocitos a la zona de lesión, y ii) la producción de vainas de mielina que recubran los axones, con la consiguiente recuperación de la transmisión y aporte trófico. Para estudiar el primero de los enfoques, en este trabajo se utilizaron cultivos de OPCs de ratones PO aislados mediante la técnica de MACS, encontrando un aumento de su supervivencia y capacidad de proliferación en presencia de factores solubles producidos por las MDSCs, así como mayor tasa de diferenciación hacia oligodendrocitos maduros.

Por otra parte, para el estudio de la segunda fase existen varias aproximaciones. Los modelos existentes para el estudio *in vivo* de la remielinización tratan de reducir la influencia del sistema inmune adaptativo de forma que se permita separar el mecanismo de respuesta a una desmielinización primaria del mecanismo de respuesta a la inflamación, evitando de esta forma la complicación de una respuesta autoinmune simultánea (Franklin et al., 2017). Entre ellos, la desmielinización por toxina es de los más utilizados, ya sea de forma oral por cuprizona (Medina-Rodríguez et al., 2017), por inyección estereotáxica de lisolecitina en cuerpo calloso (Medina-Rodríguez et al., 2017) o médula

espinal (Franklin and ffrench-Constant, 2017) y de bromuro de etidio en los pedúnculos cerebelosos (Franklin and ffrench-Constant, 2017); mientras que *in vitro* se utilizan cultivos organotípicos de cerebelo o brainstem (de la Fuente et al., 2017; Dombrowski et al., 2017). En este trabajo se decidió estudiar la relación entre las MDSCs y la capacidad remielinizante de la oligodendroglía utilizando cultivos organotípicos de cerebelo de ratones P7, los cuales se lesionaron con lisolecitina. Este modelo permite el estudio de la remielinización en un contexto en el que el lugar con daño de la mielina está definido anatómicamente y es independiente de daño tisular provocado por el sistema inmune, donde el proceso de desmielinización está temporalmente separado del proceso de remielinización, y donde existe una regeneración de la vainas de mielina que cubren los axones desmielinizados.

La elección de ratones neonatales (P0-P7) para los abordajes experimentales de esta parte de la Tesis Doctoral se realizó siendo conscientes en todo momento de las limitaciones de las conclusiones obtenidas debido a la alta diferencia que existe entre los OPCs neonatales y adultos. A este respecto, en estudios comparativos de la respuesta de este tipo celular en condiciones normales y en lesión, se vio que en lesión los OPCs adultos adquieren perfiles de expresión parecidos a los de los neonatales con la regulación al alza de por ejemplo genes relacionados con el sistema inmune como son IL-1 β y CCL2 (Moyon et al., 2015), y con una capacidad aumentada de movilización. Esta reversión se debe a que la función de cubrir axones sólo tiene sentido en OPCs neonatales durante el desarrollo,

o de adultos tras un insulto desmielinizante, pero no en OPCs adultos en condiciones fisiológicas.

La contribución de la respuesta inmune innata -es decir, la microglía residente y los monocitos infiltrados- a los procesos de remielinización ha sido ampliamente descrita (Miron et al., 2014; Moore et al., 2015). Entre las numerosas evidencias podemos encontrar: i) la correlación directa entre una efectiva limpieza del debris de mielina y una mayor capacidad de remielinización (Boven et al., 2006; Butovsky et al., 2006a; Kotter et al., 2001); ii) la producción de una amplia variedad de moléculas reguladoras por parte de células infiltradas derivadas de monocitos y microglía con efectos directos sobre los OPCs (Madsen et al., 2016; Miron et al., 2013; Patel et al., 2010; Yuen et al., 2013); iii) la remodelación de la matriz extracelular por parte de los macrófagos infiltrados y microglía tiene claros efectos sobre la remielinización (Clemente et al., 2013); y iv) el soporte metabólico principalmente a través de la producción de lactato y hierro (Rawji and Yong, 2013). Sin embargo, pocos estudios han relacionado la respuesta inmune adaptativa, principalmente linfocitos T, con los mecanismos que contribuyen a la regeneración de la mielina. Entre ellos, se ha visto un efecto positivo de las células T efectoras específicas contra antígenos de mielina, las cuales activan la proliferación de células NG2 (El Behi M. et al., 2017; Nielsen et al., 2017a); y de las células T reg (por otra parte promovidas por las MDSCs) sobre la diferenciación de los OPCs y la remielinización, efectos mediados por la proteína asociada a la ECM sobreexpresada en nefroblastoma (*nephroblastoma overexpressed*, NOV o CCN3 (Dombrowski et al.,

2017). Sin embargo, un estudio reciente de El Behi y colaboradores ha puesto de manifiesto que las células de respuesta inmune innata y adaptativa están muy relacionadas, también en el contexto de promoción de la remielinización, y que esta relación está asociada con la severidad de la EM. Así, se demuestra que los diferentes perfiles de secreción de los linfocitos extraídos de pacientes polarizan de distinta manera a la microglía, lo que da lugar a un distinto grado de maduración de los OPCs hacia fenotipos CNPasa⁺ que se refleja, finalmente, en una diferente evolución clínica (El Behi M. et al., 2017). Esto supone la demostración de un papel relevante de la respuesta inmune adaptativa en la remielinización a través de la polarización de la microglía, lo que apoya la hipótesis de este trabajo de un papel similar por parte de las MDSCs.

Cuando las IMCs cumplen todos los requisitos para poder llamarse MDSCs, es decir, efectivamente suprimen la respuesta inmune a través de los mecanismos ya descritos, se podrían incluir dentro de la categoría de células con función antiinflamatoria/reguladora o M2. Sin embargo, esta clasificación en “estados de activación” clásico o M1 y alternativo o M2 claramente diferenciados se utiliza como términos de conveniencia y está cada vez más en desuso, sustituyéndose más bien por un gradiente entre una respuesta y otra, con marcadores compartidos y simultáneos en el mismo tipo celular, que presentan una alta plasticidad dependiente del ambiente inflamatorio circundante (McMurrin et al., 2016). En EM, se ha demostrado la presencia de macrófagos/microglía con fenotipo M1 en la sustancia blanca aparentemente normal y

en sujetos sanos, presentando un fenotipo intermedio M1/M2 en las lesiones desmielinizantes activas (Vogel et al., 2013). Respecto a los procesos de remielinización, de los diversos estudios *in vitro* se deduce que el estado M1 se encuentra asociado con la fase de reclutamiento de OPCs mientras que el M2 se asocia a la fase de diferenciación (Mikita et al., 2011; Miron et al., 2013). Sin embargo, las MDSCs difieren de los macrófagos y microglía tipo M2 en capacidad fagocítica, presentación de antígeno, activación de fenotipos Th1/Th17, entre otros (Melero-Jerez et al., 2016). De hecho, una de las características diferenciadoras es el hecho de que mientras que los macrófagos M2 presentan Arg-I, no se ha visto que expresen iNOS al mismo tiempo (Melero-Jerez et al., 2016). Las MDSCs representan un claro ejemplo de células con características intermedias entre ambos estados de actividad teóricos, expresando iNOS (clásico “marcador M1”) y Arg-I (clásico “marcador M2”), y presentando una baja expresión de MHC-II. Sin embargo, aunque su presencia y actividad en el sistema inmune periférico está bien descrita, a día de hoy se desconoce el momento temporal en el que las MDSCs actúan como tal, así como el tiempo que tardan en madurar hacia fenotipos maduros una vez dentro del parénquima del sistema nervioso. Estos tiempos son de vital importancia para la comprensión de los factores que puedan estar secretando y que afecten a las células precursoras de oligodendrocitos.

En este trabajo se demuestra que el medio condicionado de MDSCs aisladas del pico de ratones con EAE (es decir, en su momento de máxima capacidad inmunosupresora; Moliné-Velázquez et al., 2011; Zhu et al., 2007) promueve la supervivencia, la

proliferación y la diferenciación de células A2B5⁺ y O4⁺ hacia células con fenotipo MBP⁺, afectando de forma negativa a su migración. El gangliósido A2B5 es ampliamente utilizado tanto en MACS como en inmunopanning para el aislamiento de células precursoras de oligodendrocitos tanto en ratón (Kuroda et al., 2017) como en humano (Lu et al., 2015), si bien es cierto que la densidad de cultivo y la definición del medio resultan de importancia clave para evitar su diferenciación hacia astrocitos (Raff et al., 1983). La caracterización incluida en este trabajo demuestra la alta pureza de los cultivos primarios utilizados, con una práctica totalidad de OPCs frente a astrocitos. Recientes estudios demuestran que las células A2B5⁺ pueden diferenciarse a células positivas para el marcador de astrocitos GFAP, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Gomez-Pinedo et al., 2017). La abundancia de células A2B5⁺, también llamadas células precursoras gliales (GPC, *glial precursor cells*, en inglés), varía durante el desarrollo. En estadios embrionarios y neonatales de la especie humana las células A2B5⁺ que dan lugar a OPCs son las más abundantes (alrededor de un 73 %), las células dobles positivas constituyen el 15 % y las células O4⁺ son minoría (11 %). Sin embargo, en el individuo adulto el contenido es el contrario, puesto que la población de células A2B5⁺ es de un 2 %, las células dobles positivas son un 12 % y las células O4⁺ constituyen alrededor de un 63 % del linaje de células mielinizantes (Leong et al., 2014). La comparación con el ratón realizada por Barateiro y colaboradores establece una equivalencia entre las semanas 18-28 de gestación en humanos con el

período postnatal de ratones (P0-P2), en los cuales la población de células O4⁺ (preoligodendrocitos/oligodendrocitos inmaduros) es la minoritaria. A P7 en ratón, y entre las semanas de gestación 28-40 para humanos, predominan los oligodendrocitos inmaduros con un incremento progresivo de células MBP⁺ que en ratón culmina con el fin del proceso de mielinización de desarrollo a las 2-3 semanas postnatales y en humanos alcanza hasta el final de la adolescencia (Barateiro and Fernandes, 2014). Esta heterogeneidad resulta clave para la elección del anticuerpo utilizado para el aislamiento de OPCs a distintas edades del desarrollo.

El reclutamiento de OPCs y su proliferación, en este orden o el contrario, hacia las zonas lesionadas, constituye la primera fase para la remielinización. La activación de los OPCs se ha demostrado ser inducida por microglía, macrófagos derivados de monocitos infiltrados y astrocitos (Arai and Lo, 2009; Clemente et al., 2013; Franklin and French-Constant, 2017; Hammond et al., 2014; Miron et al., 2013; Moyon et al., 2015; Yuan et al., 2017); con una combinación de factores que promueven por una parte la proliferación de los OPCs (como CXCL1, IL1- β , etc.) y por otros que inhiben la diferenciación hacia oligodendrocitos, como los ligandos que activan las vías de Notch y Wnt, la acumulación de ácido hialurónico en la matriz extracelular (Sloane et al., 2010), LINGO-1 (Mi et al., 2005; Mi et al., 2009) y PSA-NCAM (Werneburg et al., 2017). Para la segunda fase, la diferenciación y formación de vainas de mielina, es necesario que las células salgan del ciclo celular para poder madurar, lo que da a entender la exclusividad de ambos procesos. A día

de hoy, siguen faltando datos sobre los mecanismos que regulan la transición entre ambos estados, si bien se sabe que uno de ellos pueda ser una señal de proximidad de células con el mismo fenotipo, ya que, a mayor densidad, menor necesidad de proliferar, lo que por lo tanto constituye un estímulo para la diferenciación (Rosenberg et al., 2008). Por otra parte, la mielina contiene inhibidores de la diferenciación de los OPCs (Plemel et al., 2013). Sin embargo, numerosos estudios han demostrado la promoción de ambos procesos (proliferación y diferenciación) de forma simultánea (Miron et al., 2013; Wu et al., 2014; Zhang et al., 2015). Mientras que tanto la microglía polarizada hacia M1 como hacia M2 inducía proliferación y migración, sólo la M2 promovía diferenciación (Miron et al., 2013). También se ha descrito que el cultivo de células madre neurales en presencia de medio condicionado de microglía M2 inducía la generación de células Tuj1⁺ y Olig2⁺, y una reducción de GFAP⁺, mediado por la vía de señalización PPAR γ (Yuan et al., 2017). Además, el presente trabajo demuestra el papel de las MDSC en la promoción de supervivencia de los OPCs, observándose una disminución en las células Olig2⁺ que presentaban marcaje positivo para TUNEL (según la literatura, Barateiro and Fernandes, 2014), demostrado también por el trabajo de Miron para células M2. Además, la depleción de células tipo M2 mediada por liposomas de clodronatos manosilado que se unen al receptor de manosa upregulado en esta condición, impide la diferenciación hacia fenotipos maduros tipo MAG⁺ y MBP⁺. Así, puesto que este receptor de manosa se encuentra también upregulado en esta población,

cabe pensar que las MDSCs tengan un rol similar al descrito por Miron y colaboradores (Kodumudi et al., 2010; Miron et al., 2013). Los efectos observados de las MDSCs sobre los OPCs perpetúan el debate entre proliferación *versus* diferenciación, bien como procesos excluyentes y secuenciales o como procesos simultáneos en el tiempo y en el lugar. El hecho de que sean procesos excluyentes tiene sentido si se habla de una célula determinada, la cual no puede dividirse y madurar a la vez. Sin embargo, cuando se habla de subpoblaciones, y más teniendo en cuenta el ambiente inflamatorio al que los OPCs se enfrentan en su camino hacia la regeneración del tejido en las lesiones de EAE y EM, tiene lógica pensar en un equilibrio dinámico de producción de señales inductoras e inhibitoras de la proliferación/diferenciación dentro de la lesión. Tomando como referencia la entrada de las MDSCs a través de la BHE, se podría pensar que los factores solubles que secretan pueden no alcanzar en la misma concentración OPCs circundantes o lejanos, de forma que los diferentes factores secretados por una misma MDSC tengan efectos contrapuestos dependiendo de la distancia a la que se encuentre la subpoblación de OPCs, del ambiente inflamatorio de las distintas zonas de la lesión y del resto del SNC no lesionado, y del estadio de maduración y la “receptividad” de cada OPC individual. Para dilucidar si este es el escenario sería necesario el estudio *in vivo* de los OPCs proliferantes dentro y fuera de la lesión y su relación de distancia con las MDSCs infiltradas en el pico de la EAE.

En cuanto a la última fase, la de cobertura efectiva de los axones desmielinizados, nuestros

datos apuntan a que el efecto de los factores solubles de las MDSCs sobre los OPCs y oligodendrocitos es insuficiente, puesto que tras una lesión desmielinizante provocada por lisolecitina no consiguen aumentar la remielinización de los axones. Sin embargo, estos factores sí fueron capaces de aumentar la mielinización en ausencia de estímulo desmielinizante. Para poder explicar los resultados observados en mielinización de desarrollo frente a remielinización habría que hablar de la relación entre el oligodendrocito y el axón, así como en la capacidad intrínseca del oligodendrocito de mielinizar en función de un diámetro del axón en expansión (a la que se une la capacidad adaptativa en función de la experiencia, que aumenta el grosor de la vaina de mielina; Franklin and French-Constant, 2017). Sin embargo, los axones que han sido desmielinizados ya se encuentran en su tamaño final y por lo tanto la dinámica de señales que pueden intercambiar con los oligodendrocitos es diferente. El hecho de que los factores secretados por las MDSCs tengan un efecto en diferenciación pero no en remielinización lleva a pensar que las MDSCs pudiesen tener una participación en los procesos que ocurren en la mielinización durante el desarrollo, favoreciendo la diferenciación de los OPCs hacia oligodendrocitos maduros y una efectiva mielinización. A este respecto, un reciente estudio llevado a cabo por He y colaboradores describe por primera vez la presencia y función inmunosupresora de las MDSCs en individuos neonatos de ratón y humano en condiciones fisiológicas, un papel hasta ahora descartado (He et al., 2018). En este trabajo, se describe la presencia de MDSCs esplénicas desde P1, alcanzando su mayor

capacidad inmunosupresora a P4 y disminuyendo en porcentaje gradualmente hasta las 3 semanas. Teniendo en cuenta que la mielinización en ratones ocurre entre las semanas postnatales 2 y 3 (Barateiro and Fernandes, 2014), se puede pensar que el pico de abundancia de las MDSCs coincide con el pico de proliferación y diferenciación de los OPCs en el SNC, procesos que se demuestran en este trabajo estar potenciados por las MDSCs. Aún así, se necesita más trabajo para saber si esta observación es casual o responde a una participación fisiológica de las MDSCs durante el desarrollo.

Por otra parte, en este trabajo se demuestra que los factores solubles de las MDSCs parecen disminuir la proporción de axones remielinizados 4 días después del insulto desmielinizante. Sin embargo, teniendo en cuenta la evolución temporal de la remielinización en nuestro modelo, así como la bibliografía existente, ese momento temporal se correspondería con una mayor proliferación de OPCs, estimulada por el propio insulto desmielinizante (Zhang et al., 2011). Esta promoción de la proliferación también se ha visto en este trabajo ser estimulada por los factores solubles producidos por las MDSCs lo que, unido a la propuesta incompatibilidad con la producción de mielina alrededor de los axones desnudos con la proliferación de OPCs, podría explicar esa disminución de la remielinización a 4 dpl. Sin embargo, cuatro días después la tendencia se invierte, y si bien el porcentaje de remielinización alcanzado en presencia de los factores solubles es similar al vehículo, existe una fuerte tendencia a un incremento respecto al control en ese mismo

momento temporal y resulta significativamente mayor que a 4 dpl. El hecho de que la pendiente entre los dos momentos temporales sólo en el caso de las MDSC-CM sea extremadamente acusada hace pensar en una aceleración de la remielinación. Aún así, y a falta de un mayor tamaño muestral, parece que la promoción de la diferenciación de los OPCs por parte de las MDSCs parece ser insuficiente o ineficiente por sí sola en el caso de tener que generar nuevas vainas de mielina en un sistema dañado. Esto podría deberse a que, en el ambiente inflamatorio de la lesión, los efectos observados de las MDSCs sobre los OPCs se añadirían a los que ejercen otros tipos celulares como microglía y macrófagos (Miron et al., 2013), siendo suficientes para estimular a los OPCs pero insuficientes para completar la remielinización. Además, de acuerdo a los trabajos mencionados anteriormente, sería necesario estudiar otros momentos temporales más avanzados en la remielinización, como 12 o incluso 18 dpl (de forma que se alcanzarían los 25 DIV en los que Zhang y colaboradores demuestran una remielinización completa) para comprobar los efectos de los factores solubles de las MDSCs. Por otra parte, el análisis de la remielinización ex vivo en presencia de MDSCs en lugar de su medio condicionado podría aportar más información. Sin embargo, puesto que el resto de efectos encontrados en los OPCs no requieren el contacto celular directo con las MDSCs, es de esperar que su efecto en remielinización sea también a través de un factor soluble. De hecho, Dombrowski y colaboradores demostraron los efectos potenciadores de remielinización de las células Treg utilizando el mismo abordaje experimental, y estudiando

tanto el efecto de las células Tregs en sí mismas como el medio condicionado producido por éstas (Dombrowski et al., 2017). Este mismo resultado se obtuvo con el medio condicionado de los pericitos no asociados a vasos presentes en el parénquima, los cuales se han visto que responden en caso de lesión para asociarse a la BHE y se han observado en proximidad a oligodendrocitos maduros durante la remielinización, además de participar en el yamaje vascular para la migración de OPCs durante el desarrollo (de la Fuente et al., 2017).

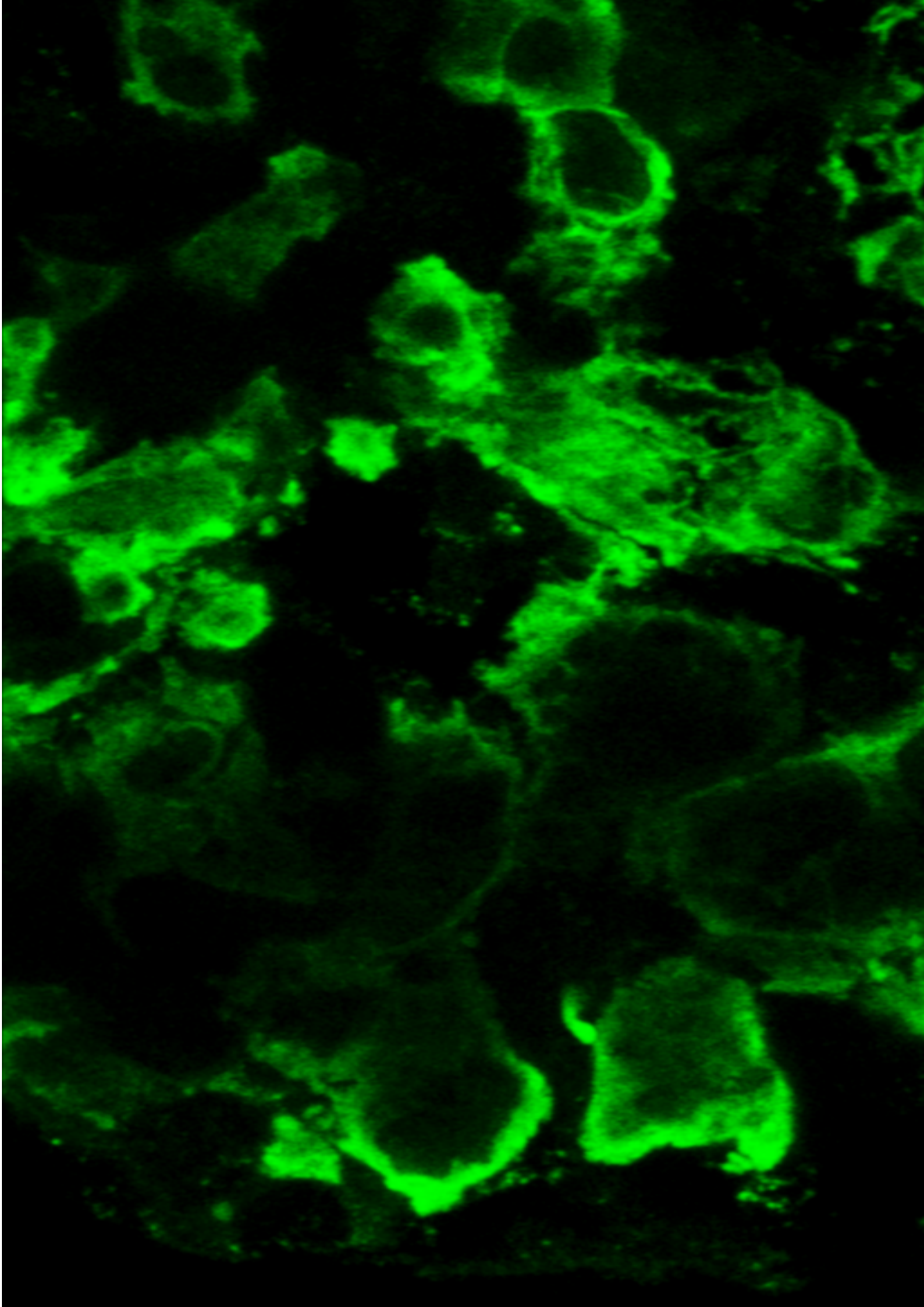
Más trabajo es necesario para descifrar la utilidad de este resultado, principalmente a través de la detección del factor o factores solubles responsables de este efecto, que pueda ser secretado por otro tipo celular.

Implicaciones terapéuticas

Basándonos en los resultados de esta Tesis Doctoral, aquí se propone una nueva diana celular endógena para el tratamiento con IFN- β , que estimule los mecanismos inmunosupresores que tienen lugar durante los episodios inflamatorios y que conlleven la remisión total o parcial de los síntomas. En la búsqueda continua de nuevas aproximaciones terapéuticas más efectivas para la EM, la potenciación de las MDSCs mediada por IFN- β podría ser utilizada como agente autólogo para la reducción de la duración de las recaídas y de la severidad de la enfermedad. A este respecto, MDSCs aisladas de pacientes de EM podrían ser potenciadas *ex vivo* y para posteriormente ser autotransplantadas, incrementando de esta forma los efectos beneficiosos del IFN- β . Es más,

esta posible terapia *ex vivo* permitiría reducir la dosis clínica administrada a los pacientes o incluso llevar a su completa abolición, contribuyendo tanto a reducir como a evitar los efectos secundarios del fármaco (de Jong et al., 2017). En cuanto a los pacientes no respondedores al tratamiento, aquí se sientan las bases para reducir la tasa del abyono del tratamiento, mediante la administración exógena de esta citoquina directamente en MDSCs *in vitro* antes de ser trasplantadas.

Por otra parte, los datos aportados en este trabajo permiten avanzar en el conocimiento de la plasticidad de las MDSCs para su uso como biomarcadores de la EAE y, finalmente, de la EM; uso que por otra parte ya se ha estudiado en otras enfermedades como rechazo a trasplantes (GVHD, Vendramin et al., 2014), melanoma (Weide et al., 2014), cáncer de tiroides (Angell et al., 2016) y otros tipos de cáncer (Meirow and Baniyash, 2017); y condiciones como fertilización *in vitro* (Zhu et al., 2017). De hecho, se ha descrito una reducción de MDSCs en sangre de pacientes de EM-RR (Cantoni et al., 2017), viéndose aumentada por el tratamiento con acetato de glatirámero. Aunque no se incluya como objetivo de esta tesis, es de esperar que la estandarización de un protocolo tan sencillo como el análisis del porcentaje de MDSCs en sangre de pacientes podría no sólo predecir la evolución de la enfermedad sino que, sabiendo que su actividad puede ser potenciada por uno de los fármacos más utilizados y avanzando en el conocimiento de otros, se podría incluir en los factores a tener en cuenta para el diseño de una terapia personalizada.





Conclusions

CONCLUSIONES

1. El contenido de MDSCs del bazo se ve modificado con el tratamiento con una única dosis de IFN- β en el modelo animal de encefalomiелitis experimental autoinmune. El aumento del porcentaje de MDSCs del bazo en los ratones tratados está relacionado con una disminución en las poblaciones linfoides.
2. El tratamiento con IFN- β produce unas lesiones más pequeñas en la médula espinal de los ratones con encefalomiелitis experimental autoinmune, más densas y restringidas a la parte ventral. La disminución en el tamaño de las lesiones está relacionado de forma directa y positiva con una mayor presencia de células CD11b⁺Arg-I⁺.
3. El componente mieloide infiltrado en la médula espinal de ratones con encefalomiелitis experimental autoinmune tratados con IFN- β se ve enriquecido en células Arg-I⁺, las cuales presentan un fenotipo más inmunosupresor como se puede deducir de una menor expresión de Gr-1 y una mayor expresión de CD124.
4. La densidad de linfocitos T CD4⁺ en apoptosis es mayor en los ratones con encefalomiелitis experimental autoinmune tratados con IFN- β , apoptosis que se demuestra estar al menos parcialmente mediada por la promoción *in vivo* de la capacidad inmunosupresora de las MDSCs, como se observa tras el co-cultivo de linfocitos T con MDSCs extraídas de ratones en el pico de la enfermedad que habían sido tratados con el fármaco.
5. La promoción de la capacidad inmunosupresora de las MDSCs está directamente mediada por el fármaco, mediante el mantenimiento de su estado de inmadurez. El efecto del IFN- β sobre la expresión de F4/80 por parte de las MDSCs es dependiente de la presencia del fármaco, e independiente y duradero en el caso de la expresión de Ly-6C.
6. El contenido de MDSCs del bazo se correlaciona de forma indirecta con la agresividad de la encefalomiелitis experimental autoinmune, la pérdida de peso y el porcentaje de poblaciones linfoides.
7. Un alto contenido de MDSCs del bazo está relacionado con una mayor apoptosis de



linfocitos T, una menor destrucción de mielina y un menor daño de los axones en el sistema nervioso central.

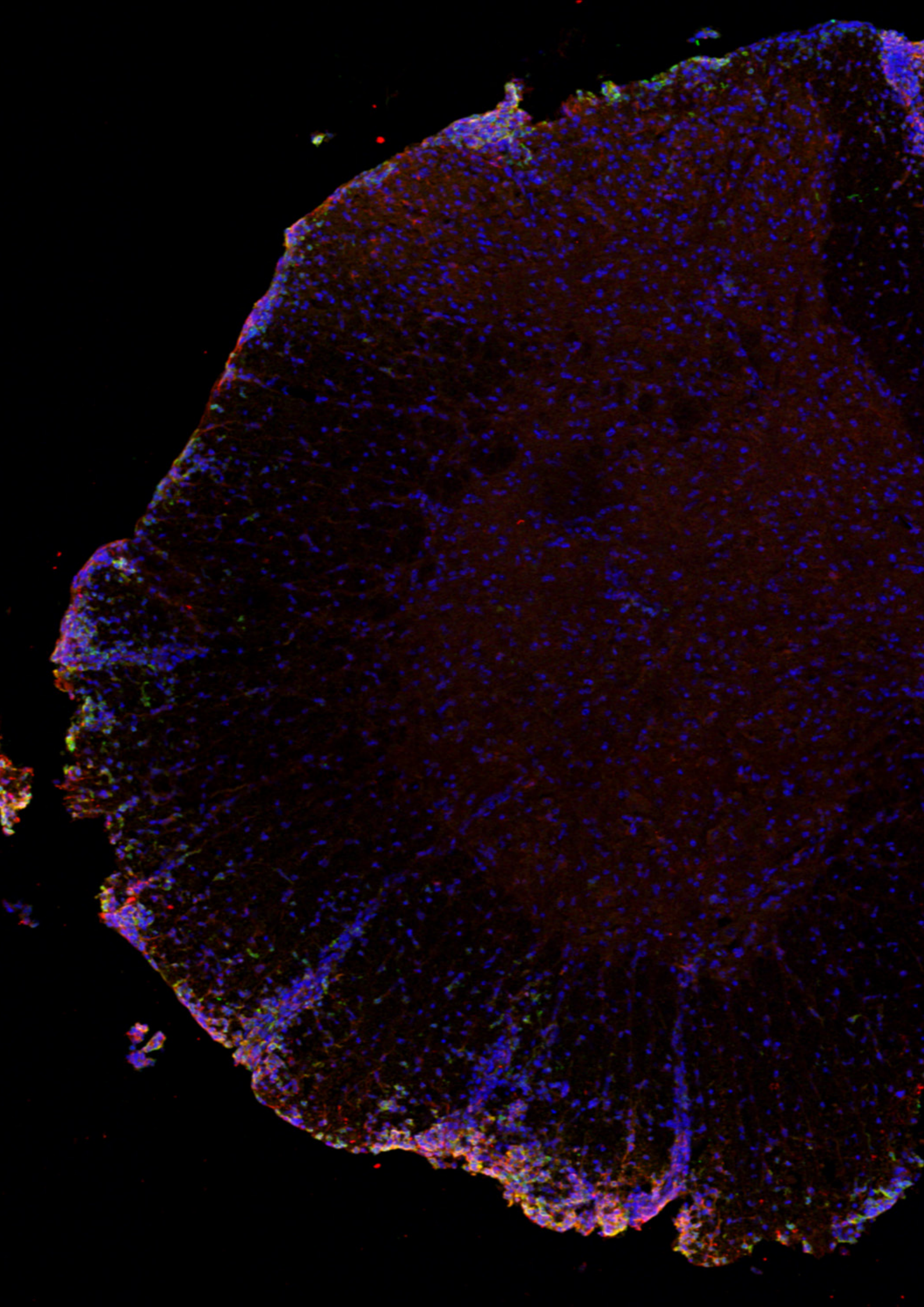
8. Los factores solubles secretados por MDSCs extraídas del bazo de ratones en el punto de máxima afectación del modelo de encefalomiелitis experimental autoinmune promueven la proliferación, supervivencia y diferenciación de las células precursoras de oligodendrocitos hacia fenotipos mielinizantes, mientras que no afectan a su migración.

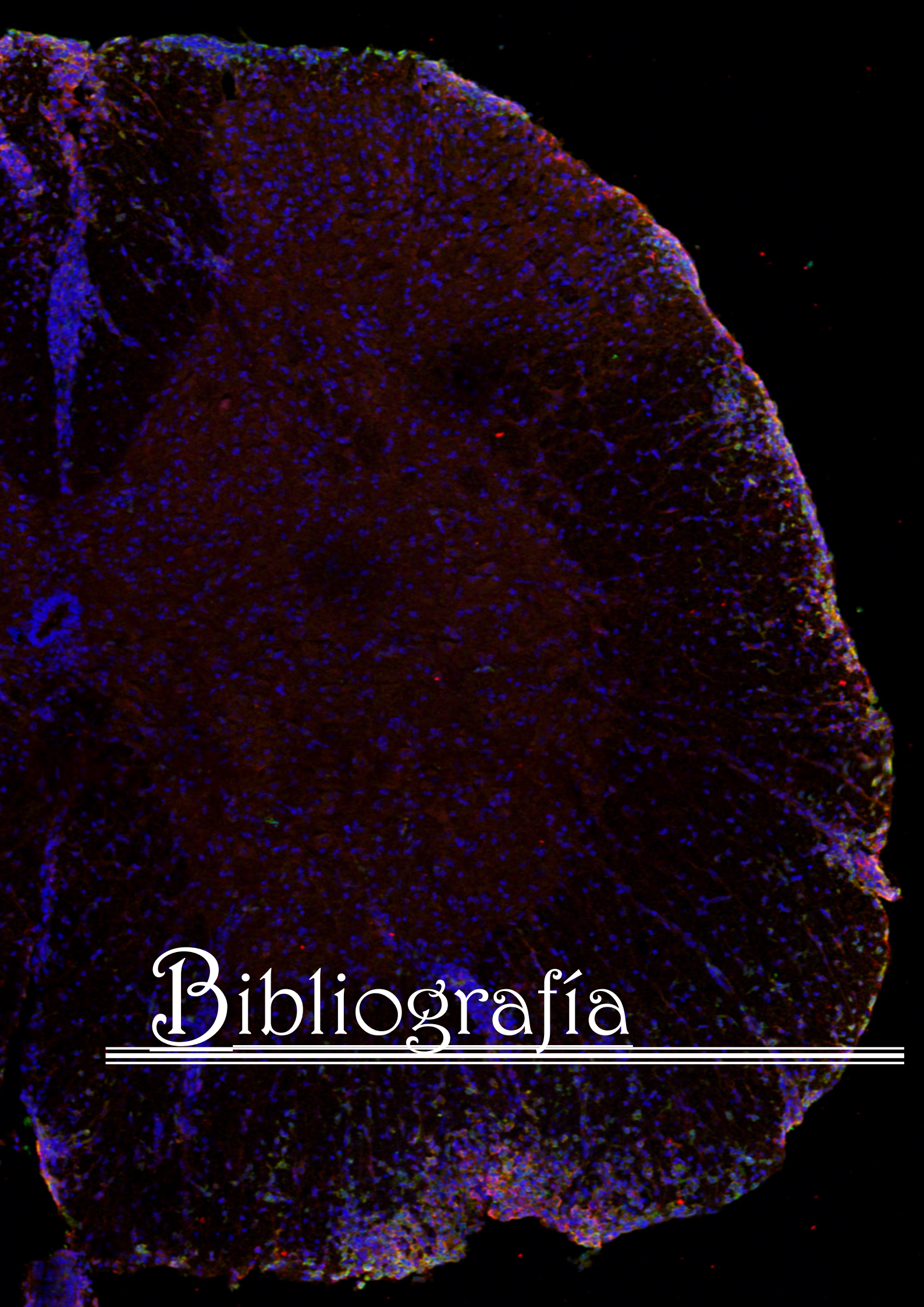
9. Los factores solubles secretados por MDSCs extraídas en el pico de la encefalomiелitis experimental autoinmune tienen un efecto potenciador de la remielinización en cultivos organotípicos de cerebelo, tras ser lesionados con lisolecitina.

CONCLUSIONS

1. The splenic content of MDSCs is modified by the treatment with a single dosis of IFN- β in the animal model of EAE. The increase in the percentage of splenic MDSCs is related to a decrease in the lymphoid populations.
2. The treatment with IFN- β produces spinal cord lesions with smaller size in the of mice with EAE, that are more dense and restricted to the ventral part. The reduction in size is related in a direct way with a higher presence of CD11b⁺Arg-I⁺ cells.
3. The infiltrated component in the spinal cord of EAE mice after IFN- β is enriched in Arg-I⁺ cells, presenting a more immunosuppressive phenotype as assessed by a lower Gr-1 expression and a higher CD124 expression.
4. The density of apoptotic CD4⁺ T cells is higher in the EAE mice after IFN- β treatment, being at least partially mediated by the *in vivo* promotion of the immunosuppressive capacity of MDSCs, as observed after the T cell-MDSCs co-culture.
5. The promotion of the MDSC immunosuppressive activity is directly mediated by IFN- β trough the maintenance of their immature state. The effect of IFN- β over F4/80 expression in MDSCs is dependent on the presence of the drug, and independent and long-lasting in the case of Ly-6C.
6. The MDSC content is indirectly correlated with the aggressivity of EAE, the weight loss and the percentage of the lymphoid population.
7. A high content of splenic MDSCs is related with a higher T cell apoptosis, a lower myelin dysruption and a lower axonal damage in the CNS.
8. The soluble factors secrected by MDSC isolated from EAE mice at the peak of the disease promote the proliferation, survival and differentiation of OPCs toward myelinating phenotypes, whereas OPC migration remains unaffected.
9. The soluble factors secreted by MDSCs isolated from EAE mice at the peak of the disease accelerate the *ex vivo* remyelination.







Bibliografía

REFERENCIAS

1. Absinta M, Sati P, Reich DS (2016) Advanced MRI and staging of multiple sclerosis lesions. *Nat Rev Neurol* 12:358-368.
2. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, McNagny KM, Rossi FM (2011) Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci* 14:1142-1149.
3. Alonso A, Hernan MA (2008) Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology* 71:129-135.
4. Angell TE, Lechner MG, Smith AM, Martin SE, Groshen SG, Maceri DR, Singer PA, Epstein AL (2016) Circulating Myeloid-Derived Suppressor Cells Predict Differentiated Thyroid Cancer Diagnosis and Extent. *Thyroid* 26:381-389.
5. Apolloni E, Bronte V, Mazzoni A, Serafini P, Cabrelle A, Segal DM, Young HA, Zanollo P (2000) Immortalized myeloid suppressor cells trigger apoptosis in antigen-activated T lymphocytes. *J Immunol* 165:6723-6730.
6. Arai K, Lo EH (2009) An oligovascular niche: cerebral endothelial cells promote the survival and proliferation of oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci* 29:4351-4355.
7. Archie Bouwer HG, Gregory CR, Wegmann KW, Hinrichs DJ (2015) Absence of the memory response to encephalitogen following intergender adoptively transferred experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 278:194-199.
8. Arnason BG (2005) Long-term experience with interferon beta-1b (Betaferon) in multiple sclerosis. *J Neurol* 252 Suppl 3:iii28-iii33.
9. Arnett HA, Wang Y, Matsushima GK, Suzuki K, Ting JP (2003) Functional genomic analysis of remyelination reveals importance of inflammation in oligodendrocyte regeneration. *J Neurosci* 23:9824-9832.
10. Ascherio A, Munger KL (2016) Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention-An Update. *Semin Neurol* 36:103-114.
11. Axtell RC, de Jong BA, Boniface K, van d, V, Bhat R, De SP, Naves R, Han M, Zhong F, Castellanos JG, Mair R, Christakos A, Kolkowitz I, Katz L, Killestein J, Polman CH, de Waal MR, Steinman L, Raman C (2010) T helper type 1



and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat Med* 16:406-412.

12. Barateiro A, Fernandes A (2014) Temporal oligodendrocyte lineage progression: in vitro models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochim Biophys Acta* 1843:1917-1929.

13. Barnett MH, Prineas JW (2004) Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol* 55:458-468.

14. Bartzokis G, Lu PH, Mintz J (2007) Human brain myelination and amyloid beta deposition in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 3:122-125.

15. Becher B, Durell BG, Noelle RJ (2002) Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J Clin Invest* 110:493-497.

16. Behrangi N, Namvar N, Ataei M, Dizaji S, Javdani G, Sanati MH (2017) MMP9 Gene Expression Variation by Ingesting Tart Cherry and P-Coumaric Acid During Remyelination in the Cuprizone Mouse Model. *Acta Med Iran* 55:539-549.

17. Benner B, Martorell AJ, Mahadevan P, Najm FJ, Tesar PJ, Freundt EC (2016) Depletion

of Olig2 in oligodendrocyte progenitor cells infected by Theiler's murine encephalomyelitis virus. *J Neurovirol* 22:336-348.

18. Bennett JL, Stuve O (2009) Update on inflammation, neurodegeneration, and immunoregulation in multiple sclerosis: therapeutic implications. *Clin Neuropharmacol* 32:121-132.

19. Benveniste EN (1997) Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med (Berl)* 75:165-173.

20. Berard JL, Wolak K, Fournier S, David S (2010) Characterization of relapsing-remitting and chronic forms of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Glia* 58:434-445.

21. Berer K, Gerdes LA, Cekanaviciute E, Jia X, Xiao L, Xia Z, Liu C, Klotz L, Stauffer U, Baranzini SE, Kumpfel T, Hohlfeld R, Krishnamoorthy G, Wekerle H (2017) Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:10719-10724.

22. Birgbauer E, Rao TS, Webb M (2004) Lysolecithin induces demyelination in vitro in a cerebellar slice culture system. *J Neurosci Res* 78:157-166.



23. Bodini B, Veronese M, Garcia-Lorenzo D, Battaglini M, Poirion E, Chardain A, Freeman L, Louapre C, Tchikviladze M, Papeix C, Dolle F, Zalc B, Lubetzki C, Bottlaender M, Turkheimer F, Stankoff B (2016) Dynamic imaging of individual remyelination profiles in multiple sclerosis. *Ann Neurol*.
24. Boven LA, van MM, van ZM, Wierenga-Wolf A, Hintzen RQ, Boot RG, Aerts JM, Amor S, Nieuwenhuis EE, Laman JD (2006) Myelin-laden macrophages are anti-inflammatory, consistent with foam cells in multiple sclerosis. *Brain* 129:517-526.
25. Bowen JL, Olson JK (2009) Innate immune CD11b⁺Gr-1⁺ cells, suppressor cells, affect the immune response during Theiler's virus-induced demyelinating disease. *J Immunol* 183:6971-6980.
26. Brendecke SM, Prinz M (2012) How type I interferons shape myeloid cell function in CNS autoimmunity. *J Leukoc Biol* 92:479-488.
27. Bribián A, Barallobre MJ, Soussi-Yanicostas N, de Castro F (2006) Anosmin-1 modulates the FGF-2-dependent migration of oligodendrocyte precursors in the developing optic nerve. *Mol Cell Neurosci* 33:2-14.
28. Bribián A, Esteban PF, Clemente D, Soussi-Yanicostas N, Thomas JL, Zalc B, de CF (2008) A novel role for anosmin-1 in the adhesion and migration of oligodendrocyte precursors. *Dev Neurobiol* 68:1503-1516.
29. Brochet B, Deloire MS, Touil T, Anne O, Caille JM, Dousset V, Petry KG (2006) Early macrophage MRI of inflammatory lesions predicts lesion severity and disease development in relapsing EAE. *Neuroimage* 32:266-274.
30. Bronte V, Apolloni E, Cabrelle A, Ronca R, Serafini P, Zamboni P, Restifo NP, Zanovello P (2000) Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood* 96:3838-3846.
31. Bronte V, Brandau S, Chen SH, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, Mandruzzato S, Murray PJ, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, Rodríguez PC, Sica A, Umansky V, Vonderheide RH, Gabrilovich DI (2016) Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun* 7:12150.
32. Bronte V, Zanovello P (2005) Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* 5:641-654.
33. Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV, Thompson AJ (2014) Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology* 83:1022-1024.

34. Brucklacher-Waldert V, Stuermer K, Kolster M, Wolthausen J, Tolosa E (2009) Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain* 132:3329-3341.
35. Buessow SC, Paul RD, Miller AM, Lopez DM (1984) Lymphoreticular cells isolated by centrifugal elutriation from a mammary adenocarcinoma. I. Characterization of an in situ lymphocyte suppressor population by surface markers and functional reactivity. *Int J Cancer* 33:79-85.
36. Butovsky O, Koronyo-Hamaoui M, Kunis G, Ophir E, Landa G, Cohen H, Schwartz M (2006a) Glatiramer acetate fights against Alzheimer's disease by inducing dendritic-like microglia expressing insulin-like growth factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11784-11789.
37. Butovsky O, Landa G, Kunis G, Ziv Y, Avidan H, Greenberg N, Schwartz A, Smirnov I, Pollack A, Jung S, Schwartz M (2006b) Induction and blockage of oligodendrogenesis by differently activated microglia in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 116:905-915.
38. Butovsky O, Siddiqui S, Gabriely G, Lanser AJ, Dake B, Murugaiyan G, Doykan CE, Wu PM, Gali RR, Iyer LK, Lawson R, Berry J, Krichevsky AM, Cudkowicz ME, Weiner HL (2012) Modulating inflammatory monocytes with a unique microRNA gene signature ameliorates murine ALS. *J Clin Invest* 122:3063-3087.
39. Butt AM, Fern RF, Matute C (2014) Neurotransmitter signaling in white matter. *Glia* 62:1762-1779.
40. Campillo JA, Pelaez B, Angulo I, Bensussan A, Subiza JL (2006) Involvement of IFN β on IFN γ and nitric oxide (NO) production by bone marrow (BM) cells in response to lipopolysaccharide. *Biomed Pharmacother* 60:541-547.
41. Cantoni C, Cignarella F, Ghezzi L, Mikesell B, Bollman B, Berrien-Elliott MM, Ireland AR, Fehniger TA, Wu GF, Piccio L (2017) Mir-223 regulates the number and function of myeloid-derived suppressor cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol* 133:61-77.
42. Carmody RJ, Hilliard B, Maguschak K, Chodosh LA, Chen YH (2002) Genomic scale profiling of autoimmune inflammation in the central nervous system: the nervous response to inflammation. *J Neuroimmunol* 133:95-107.
43. Casacuberta-Serra S, Pares M, Golbano A, Coves E, Espejo C, Barquinero J (2017) Myeloid-derived suppressor cells can be efficiently generated from human

hematopoietic progenitors and peripheral blood monocytes. *Immunol Cell Biol* 95:538-548.

44. Chang A, Nishiyama A, Peterson J, Prineas J, Trapp BD (2000) NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *J Neurosci* 20:6404-6412.

45. Chang A, Tourtellotte WW, Rudick R, Trapp BD (2002) Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 346:165-173.

46. Cheng W, Zhao Q, Xi Y, Li C, Xu Y, Wang L, Niu X, Wang Z, Chen G (2015) IFN-beta inhibits T cells accumulation in the central nervous system by reducing the expression and activity of chemokines in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Immunol* 64:152-162.

47. Christy AL, Walker ME, Hessner MJ, Brown MA (2013) Mast cell activation and neutrophil recruitment promotes early and robust inflammation in the meninges in EAE. *J Autoimmun* 42:50-61.

48. Clemente D, Ortega MC, Arenzana FJ, de Castro F. (2011) FGF-2 and Anosmin-1 are selectively expressed in different types of multiple sclerosis lesions. *J Neurosci* 31:14899-14909.

49. Clemente D, Ortega MC, Melero-Jerez C, de CF (2013) The effect of glia-glia interactions on oligodendrocyte precursor cell biology during development and in demyelinating diseases. *Front Cell Neurosci* 7:268.

50. Cleveland MG, Lane RG, Klimpel GR (1988) Spontaneous IFN-beta production. A common feature of natural suppressor systems. *J Immunol* 141:2043-2049.

51. Colpitts SL, Kasper EJ, Kever A, Liljenberg C, Kirby T, Magori K, Kasper LH, Ochoa-Reparaz J (2017) A bidirectional association between the gut microbiota and CNS disease in a biphasic murine model of multiple sclerosis. *Gut Microbes* 1-13.

52. Comi G, Filippi M, Barkhof F, Durelli L, Edan G, Fernandez O, Hartung H, Seeltrayes P, Sorensen PS, Rovaris M, Martinelli V, Hommes OR (2001) Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *Lancet* 357:1576-1582.

53. Compston A, Coles A (2008) Multiple sclerosis. *Lancet* 372:1502-1517.

54. Condamine T, et al. (2016) Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Sci Immunol* 1.



55. Condamine T, Mastio J, Gabrilovich DI (2015) Transcriptional regulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Leukoc Biol* 98:913-922.
56. Confavreux C, Vukusic S (2006a) Age at disability milestones in multiple sclerosis. *Brain* 129:595-605.
57. Confavreux C, Vukusic S (2006b) Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. *Brain* 129:606-616.
58. Cripps JG, Gorham JD (2011) MDSC in autoimmunity. *Int Immunopharmacol* 11:789-793.
59. Cripps JG, Wang J, Maria A, Blumenthal I, Gorham JD (2010) Type 1 T helper cells induce the accumulation of myeloid-derived suppressor cells in the inflamed Tgfb1 knockout mouse liver. *Hepatology* 52:1350-1359.
60. Cuenca AG, Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, Moreno C, Scumpia PO, Laface DM, Heyworth PG, Efron PA, Moldawer LL (2011) A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma. *Mol Med* 17:281-292.
61. Cui QL, Kuhlmann T, Miron VE, Leong SY, Fang J, Gris P, Kennedy TE, Almazan G, Antel J (2013) Oligodendrocyte progenitor cell susceptibility to injury in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 183:516-525.
62. Dandekar AA, Wu GF, Pewe L, Perlman S (2001) Axonal damage is T cell mediated and occurs concomitantly with demyelination in mice infected with a neurotropic coronavirus. *J Virol* 75:6115-6120.
63. Das P, Drescher KM, Geluk A, Bradley DS, Rodríguez M, David CS (2000) Complementation between specific HLA-DR and HLA-DQ genes in transgenic mice determines susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Hum Immunol* 61:279-289.
64. de Castro F, Bribián A (2005) The molecular orchestra of the migration of oligodendrocyte precursors during development. *Brain Res Brain Res Rev* 49:227-241.
65. de Castro F, Bribián A, Ortega MC (2013) Regulation of oligodendrocyte precursor migration during development, in adulthood and in pathology. *Cell Mol Life Sci* 70:4355-4368.
66. De Feo D, Merlini A, Brambilla E, Ottoboni L, Laterza C, Menon R, Srinivasan S, Farina C, Garcia Manteiga JM, Butti E, Bacigaluppi M, Comi G, Greter M, Martino G (2017) Neural precursor cell-secreted TGF-beta2 redirects inflammatory monocyte-

derived cells in CNS autoimmunity. *J Clin Invest* 127:3937-3953.

67. de Jong HJ, Kingwell E, Shirani A, Cohen Tervaert JW, Hupperts R, Zhao Y, Zhu F, Evans C, van der Kop ML, Traboulsee A, Gustafson P, Petkau J, Marrie RA, Tremlett H (2017) Evaluating the safety of beta-interferons in MS: A series of nested case-control studies. *Neurology*.

68. de Jong TD, Vosslander S, Blits M, Wolbink G, Nurmohamed MT, van der Laken CJ, Jansen G, Voskuyl AE, Verweij CL (2015) Effect of prednisone on type I interferon signature in rheumatoid arthritis: consequences for response prediction to rituximab. *Arthritis Res Ther* 17:78.

69. de la Fuente AG, Errea O, van WP, Gonzalez GA, Kerninon C, Jarjour AA, Lewis HJ, Jones CA, Nait-Oumesmar B, Zhao C, Huang JK, French-Constant C, Franklin RJ (2015) Vitamin D receptor-retinoid X receptor heterodimer signaling regulates oligodendrocyte progenitor cell differentiation. *J Cell Biol* 211:975-985.

70. de la Fuente AG, et al. (2017) Pericytes Stimulate Oligodendrocyte Progenitor Cell Differentiation during CNS Remyelination. *Cell Rep* 20:1755-1764.

71. De Sanctis F, Solito S, Ugel S, Molon B, Bronte V, Marigo I (2016) MDSCs in cancer:

Conceiving new prognostic and therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta* 1865:35-48.

72. Del Río-Hortega P (2012) Studies on neuroglia: Glia with very few processes (oligodendroglia) by PA-o del RA-o-Hortega. 1921. *Clin Neuropathol* 31:440-459.

73. di Penta A., Moreno B, Reix S, Fernandez-Diez B, Villanueva M, Errea O, Escala N, Vandenbroeck K, Comella JX, Villoslada P (2013) Oxidative stress and proinflammatory cytokines contribute to demyelination and axonal damage in a cerebellar culture model of neuroinflammation. *PLoS One* 8:e54722.

74. Dimou L, Simon C, Kirchhoff F, Takebayashi H, Gotz M (2008) Progeny of Olig2-expressing progenitors in the gray and white matter of the adult mouse cerebral cortex. *J Neurosci* 28:10434-10442.

75. Dincman TA, Beare JE, Ohri SS, Whittemore SR (2012) Isolation of cortical mouse oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci Methods* 209:219-226.

76. Disanto G, Morahan JM, Barnett MH, Giovannoni G, Ramagopalan SV (2012) The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. *Neurology* 78:823-832.

77. Dishon S, Cohen SJ, Cohen IR, Nussbaum G (2017) Inhibition of Myeloid



Differentiation Factor 88 Reduces Human and Mouse T-Cell Interleukin-17 and IFN γ Production and Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Induced in Mice. *Front Immunol* 8:615.

78. Dolcetti L, Peranzoni E, Ugel S, Marigo I, Fernandez GA, Mesa C, Geilich M, Winkels G, Traggiai E, Casati A, Grassi F, Bronte V (2010) Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-LCR. *Eur J Immunol* 40:22-35.

79. Dombrowski Y, et al. (2017) Regulatory T cells promote myelin regeneration in the central nervous system. *Nat Neurosci* 20:674-680.

80. Dumont FJ, Palfree RG, Coker LZ (1986) Phenotypic changes induced by interferon in resting T cells: major enhancement of Ly-6 antigen expression. *J Immunol* 137:201-210.

81. Durelli L, Conti L, Clerico M, Boselli D, Contessa G, Ripellino P, Ferrero B, Eid P, Novelli F (2009) T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Ann Neurol* 65:499-509.

82. Dymment DA, Ebers GC, Sadovnick AD (2004) Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 3:104-110.

83. Ehrlich M, Mozafari S, Glatza M, Starost L, Velychko S, Hallmann AL, Cui QL, Schambach A, Kim KP, Bachelin C, Marteyn A, Hargus G, Johnson RM, Antel J, Sternecker J, Zaehres H, Scholer HR, Baron-Van EA, Kuhlmann T (2017) Rapid and efficient generation of oligodendrocytes from human induced pluripotent stem cells using transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E2243-E2252.

84. El Behi M., Sanson C, Bachelin C, Guillot-Noel L, Fransson J, Stankoff B, Maillart E, Sarrazin N, Guillemot V, Abdi H, Courneau-Rebeix I, Fontaine B, Zujovic V (2017) Adaptive human immunity drives remyelination in a mouse model of demyelination. *Brain* 140:967-980.

85. Elieh Ali Komi D., Grauwet K (2017) Role of Mast Cells in Regulation of T Cell Responses in Experimental and Clinical Settings. *Clin Rev Allergy Immunol*.

86. Emery B (2010) Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Science* 330:779-782.

87. Fagnani C, Neale MC, Nistico L, Stazi MA, Ricigliano VA, Buscarinu MC, Salvetti M, Ristori G (2015) Twin studies in multiple sclerosis: A meta-estimation of heritability and environmentality. *Mult Scler* 21:1404-1413.

88. Fancy SP, Harrington EP, Yuen TJ, Silbereis JC, Zhao C, Baranzini SE, Bruce CC, Otero JJ, Huang EJ, Nusse R, Franklin RJ, Rowitch DH (2011) Axin2 as regulatory and therapeutic target in newborn brain injury and remyelination. *Nat Neurosci* 14:1009-1016.
89. Fawcett J (2009) Molecular control of brain plasticity and repair. *Prog Brain Res* 175:501-509.
90. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH (1997) Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 120 (Pt 3):393-399.
91. Fisniku LK, Brex PA, Altmann DR, Miszkiel KA, Benton CE, Lanyon R, Thompson AJ, Miller DH (2008) Disability and T2 MRI lesions: a 20-year follow-up of patients with relapse onset of multiple sclerosis. *Brain* 131:808-817.
92. Fitzgerald DC, Zhang GX, El-Behi M, Fonseca-Kelly Z, Li H, Yu S, Saris CJ, Gran B, Ciric B, Rostami A (2007) Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nat Immunol* 8:1372-1379.
93. Fleming TJ, Fleming ML, Malek TR (1993) Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol* 151:2399-2408.
94. Franklin RJM, ffrench-Constant C (2017) Regenerating CNS myelin - from mechanisms to experimental medicines. *Nat Rev Neurosci* 18:753-769.
95. Frohman EM, Racke MK, Raine CS (2006a) Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 354:942-955.
96. Frohman EM, Racke MK, Raine CS (2006b) Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 354:942-955.
97. Gabrilovich D, Ishida T, Oyama T, Ran S, Kravtsov V, Nadaf S, Carbone DP (1998) Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* 92:4150-4166.
98. Gabrilovich DI (2017) Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res* 5:3-8.
99. Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, Colombo MP, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, Schreiber H (2007) The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 67:425.

100. Gabrilovich DI, Nagaraj S (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9:162-174.
101. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V (2012) Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 12:253-268.
102. Galligan CL, Pennell LM, Murooka TT, Baig E, Majchrzak-Kita B, Rahbar R, Fish EN (2010) Interferon- β is a key regulator of proinflammatory events in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mult Scler* 16:1458-1473.
103. Gallina G, Dolcetti L, Serafini P, De SC, Marigo I, Colombo MP, Basso G, Brombacher F, Borrello I, Zanollo P, Biciato S, Bronte V (2006) Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8⁺ T cells. *J Clin Invest* 116:2777-2790.
104. Gautier HO, Evans KA, Volbracht K, James R, Sitnikov S, Lundgaard I, James F, Lao-Peregrin C, Reynolds R, Franklin RJ, Karadottir RT (2015) Neuronal activity regulates remyelination via glutamate signalling to oligodendrocyte progenitors. *Nat Commun* 6:8518.
105. Giannetti P, Politis M, Su P, Turkheimer F, Malik O, Keihaninejad S, Wu K, Reynolds R, Nicholas R, Piccini P (2014) Microglia activation in multiple sclerosis black holes predicts outcome in progressive patients: an in vivo [(11)C](R)-PK11195-PET pilot study. *Neurobiol Dis* 65:203-210.
106. Gimsa U, Mitchison NA, Brunner-Weinzierl MC (2013) Immune privilege as an intrinsic CNS property: astrocytes protect the CNS against T-cell-mediated neuroinflammation. *Mediators Inflamm* 2013:320519.
107. Gold R, Linington C, Lassmann H (2006) Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129:1953-1971.
108. Goldman SA, Nedergaard M, Windrem MS (2012) Glial progenitor cell-based treatment and modeling of neurological disease. *Science* 338:491-495.
109. Gómez-Pinedo U, Sirerol-Piquer MS, Duran-Moreno M, Garcia-Verdugo JM, Matias-Guiu J (2017) Alexander Disease Mutations Produce Cells with Coexpression of Glial Fibrillary Acidic Protein and NG2 in Neurosphere Cultures and Inhibit Differentiation into Mature Oligodendrocytes. *Front Neurol* 8:255.

110. Goverman J (2009) Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 9:393-407.
111. Green AJ, Gelfand JM, Cree BA, Bevan C, Boscardin WJ, Mei F, Inman J, Arnow S, Devereux M, Abounasr A, Nobuta H, Zhu A, Friessen M, Gerona R, von Budingen HC, Henry RG, Hauser SL, Chan JR (2017) Clemastine fumarate as a remyelinating therapy for multiple sclerosis (ReBUILD): a randomised, controlled, double-blind, crossover trial. *Lancet* 390:2481-2489.
112. Greter M, Lelios I, Croxford AL (2015) Microglia Versus Myeloid Cell Nomenclature during Brain Inflammation. *Front Immunol* 6:249.
113. Gupta N, Henry RG, Strober J, Kang SM, Lim DA, Bucci M, Caverzasi E, Gaetano L, Mandelli ML, Ryan T, Perry R, Farrell J, Jeremy RJ, Ullman M, Huhn SL, Barkovich AJ, Rowitch DH (2012) Neural stem cell engraftment and myelination in the human brain. *Sci Transl Med* 4:155ra137.
114. Gutcher I, Becher B (2007) APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J Clin Invest* 117:1119-1127.
115. Haile LA, Gamrekashvili J, Manns MP, Korangy F, Greten TF (2010) CD49d is a new marker for distinct myeloid-derived suppressor cell subpopulations in mice. *J Immunol* 185:203-210.
116. Haines JD, Inglese M, Casaccia P (2011) Axonal damage in multiple sclerosis. *Mt Sinai J Med* 78:231-243.
117. Hammond TR, Gadea A, Dupree J, Kerninon C, Nait-Oumesmar B, Aguirre A, Gallo V (2014) Astrocyte-derived endothelin-1 inhibits remyelination through notch activation. *Neuron* 81:588-602.
118. Hasselmann JPC, Karim H, Khalaj AJ, Ghosh S, Tiwari-Woodruff SK (2017) Consistent induction of chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice for the longitudinal study of pathology and repair. *J Neurosci Methods* 284:71-84.
119. Hayakawa K, Pham LD, Som AT, Lee BJ, Guo S, Lo EH, Arai K (2011) Vascular endothelial growth factor regulates the migration of oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci* 31:10666-10670.
120. He YM, Li X, Perego M, Nefedova Y, Kossenkova AV, Jensen EA, Kagan V, Liu YF, Fu SY, Ye QJ, Zhou YH, Wei L, Gabrilovich DI, Zhou J (2018) Transitory presence of myeloid-derived suppressor cells in neonates is critical for control of inflammation. *Nat Med* 24:224-231.

121. Heeger PS, Valujskikh A, Lehmann PV (2000) Comprehensive assessment of determinant specificity, frequency, and cytokine signature of the primed CD8 cell repertoire induced by a minor transplantation antigen. *J Immunol* 165:1278-1284.
122. Hildeman DA, Mitchell T, Kappler J, Marrack P (2003) T cell apoptosis and reactive oxygen species. *J Clin Invest* 111:575-581.
123. Hilgendorf I, Gerhardt LM, Tan TC, Winter C, Holderried TA, Chousterman BG, Iwamoto Y, Liao R, Zirlik A, Scherer-Crosbie M, Hedrick CC, Libby P, Nahrendorf M, Weissleder R, Swirski FK (2014) Ly-6Chigh monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium. *Circ Res* 114:1611-1622.
124. Hoechst B, Gamrekelashvili J, Manns MP, Greten TF, Korangy F (2011) Plasticity of human Th17 cells and iTregs is orchestrated by different subsets of myeloid cells. *Blood* 117:6532-6541.
125. Hofstetter HH, Grau C, Buttmann M, Forsthuber TG, Gaupp S, Toyka KV, Gold R (2007) The PLPp-specific T-cell population promoted by pertussis toxin is characterized by high frequencies of IL-17-producing cells. *Cytokine* 40:35-43.
126. Hofstetter HH, Ibrahim SM, Koczan D, Kruse N, Weishaupt A, Toyka KV, Gold R (2005) Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol* 237:123-130.
127. Hofstetter HH, Shive CL, Forsthuber TG (2002) Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells. *J Immunol* 169:117-125.
128. Honda K, Takaoka A, Taniguchi T (2006) Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* 25:349-360.
129. Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, Divino CM, Chen SH (2006) Gr-1⁺CD115⁺ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res* 66:1123-1131.
130. Huang B, Wei W, Wang G, Gaertig MA, Feng Y, Wang W, Li XJ, Li S (2015) Mutant huntingtin downregulates myelin regulatory factor-mediated myelin gene expression and affects mature oligodendrocytes. *Neuron*

131. Huang JK, Jarjour AA, Oumesmar BN, Kerninon C, Williams A, Krezel W, Kagechika H, Bauer J, Zhao C, Baron-Van EA, Chambon P, ffrench-Constant C, Franklin RJM (2011) Retinoid X receptor gamma signaling accelerates CNS remyelination. *Nat Neurosci* 14:45-53.

132. Hurtado-Guerrero I, Pinto-Medel MJ, Urbaneja P, Rodríguez-Bada JL, Ortega-Pinazo J, Serrano P, Fernandez O, Leyva L, Oliver-Martos B (2017) Cross-reactivity of antibodies against interferon beta in multiple sclerosis patients and interference of the JAK-STAT signaling pathway. *Sci Rep* 7:16585.

133. Hvilsted Nielsen H., Toft-Hansen H, Lambertsen KL, Owens T, Finsen B (2011) Stimulation of adult oligodendrogenesis by myelin-specific T cells. *Am J Pathol* 179:2028-2041.

134. Ioannou M, Alissafi T, Lazaridis I, Deraos G, Matsoukas J, Gravanis A, Mastorodemos V, Plaitakis A, Sharpe A, Boumpas D, Verginis P (2012) Crucial role of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in the regulation of central nervous system autoimmune disease. *J Immunol* 188:1136-1146.

135. Iparraguirre L, Munoz-Culla M,

Prada-Luengo I, Castillo-Trivino T, Olascoaga J, Otaegui D (2017) Circular RNA profiling reveals that circular RNAs from ANXA2 can be used as new biomarkers for multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* 26:3564-3572.

136. Iwata Y, Furuichi K, Kitagawa K, Hara A, Okumura T, Kokubo S, Shimizu K, Sakai N, Sagara A, Kurokawa Y, Ueha S, Matsushima K, Kaneko S, Wada T (2010) Involvement of CD11b+ GR-1 low cells in autoimmune disorder in MRL-Fas lpr mouse. *Clin Exp Nephrol* 14:411-417.

137. Jakovceviski I, Filipovic R, Mo Z, Rakic S, Zecevic N (2009) Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain. *Front Neuroanat* 3:5.

138. Jankovic SM (2010) Injectable interferon beta-1b for the treatment of relapsing forms of multiple sclerosis. *J Inflamm Res* 3:25-31.

139. Jensen SK, Yong VW (2016) Activity-Dependent and Experience-Driven Myelination Provide New Directions for the Management of Multiple Sclerosis. *Trends Neurosci* 39:356-365.

140. Jia T, Serbina NV, Brandl K, Zhong MX, Leiner IM, Charo IF, Pamer EG (2008) Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory

monocytes during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 180:6846-6853.

141. Kalincik T, et al. (2017) Towards personalized therapy for multiple sclerosis: prediction of individual treatment response. *Brain* 140:2426-2443.

142. Kantarci OH, Lebrun C, Siva A, Keegan MB, Azevedo CJ, Inglese M, Tintore M, Newton BD, Durand-Dubief F, Amato MP, De SN, Sormani MP, Pelletier D, Okuda DT (2016) Primary Progressive Multiple Sclerosis Evolving From Radiologically Isolated Syndrome. *Ann Neurol* 79:288-294.

143. Kaskow BJ, Baecher-Allan C (2018) Effector T Cells in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*.

144. Kasper LH, Reder AT (2014) Immunomodulatory activity of interferon-beta. *Ann Clin Transl Neurol* 1:622-631.

145. Katz D, Taubenberger JK, Cannella B, McFarlin DE, Raine CS, McFarland HF (1993) Correlation between magnetic resonance imaging findings and lesion development in chronic, active multiple sclerosis. *Ann Neurol* 34:661-669.

146. Kavrochorianou N, Evangelidou M, Markogiannaki M, Tovey M, Thyphronitis G, Haralambous S (2016) IFNAR signaling

directly modulates T lymphocyte activity, resulting in milder experimental autoimmune encephalomyelitis development. *J Leukoc Biol* 99:175-188.

147. Kessaris N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD (2006) Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci* 9:173-179.

148. Kieseier BC (2011) The mechanism of action of interferon-beta in relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs* 25:491-502.

149. Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG (2009) Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci* 29:13435-13444.

150. King IL, Dickendesher TL, Segal BM (2009) Circulating Ly-6C⁺ myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood* 113:3190-3197.

151. Kipp M, van der SB, Vogel DY, Puentes F, van d, V, Baker D, Amor S (2012) Experimental in vivo and in vitro models of multiple sclerosis: EAE and beyond. *Mult Scler*

152. Kirken RA, Evans GA, Duhe RJ, DaSilva L, Malabarba MG, Erwin RA, Farrar WL (1998) Mechanisms of cytokine signal transduction: IL-2, IL-4 and prolactin as hematopoietin receptor models. *Vet Immunol Immunopathol* 63:27-36.

153. Kodumudi KN, Woan K, Gilvary DL, Sahakian E, Wei S, Djeu JY (2010) A novel chemoimmunomodulating property of docetaxel: suppression of myeloid-derived suppressor cells in tumor bearers. *Clin Cancer Res* 16:4583-4594.

154. Koehn BH, Blazar BR (2017) Role of myeloid-derived suppressor cells in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Leukoc Biol* 102:335-341.

155. Kohanbash G, McKaveney K, Sakaki M, Ueda R, Mintz AH, Amankulor N, Fujita M, Ohlfest JR, Okada H (2013) GM-LCR promotes the immunosuppressive activity of glioma-infiltrating myeloid cells through interleukin-4 receptor-alpha. *Cancer Res* 73:6413-6423.

156. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y (2006) IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*

157. Koning N, Bo L, Hoek RM, Huitinga I (2007) Downregulation of macrophage inhibitory molecules in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 62:504-514.

158. Kosa P, Ghazali D, Tanigawa M, Barbour C, Cortese I, Kelley W, Snyder B, Ohayon J, Fenton K, Lehky T, Wu T, Greenwood M, Nair G, Bielekova B (2016) Development of a Sensitive Outcome for Economical Drug Screening for Progressive Multiple Sclerosis Treatment. *Front Neurol* 7:131.

159. Kotter MR, Li WW, Zhao C, Franklin RJ (2006) Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation. *J Neurosci* 26:328-332.

160. Kotter MR, Setzu A, Sim FJ, Van RN, Franklin RJ (2001) Macrophage depletion impairs oligodendrocyte remyelination following lysolecithin-induced demyelination. *Glia* 35:204-212.

161. Kotter MR, Zhao C, Van RN, Franklin RJ (2005) Macrophage-depletion induced impairment of experimental CNS remyelination is associated with a reduced oligodendrocyte progenitor cell response and altered growth factor expression. *Neurobiol Dis* 18:166-175.



162. Koutrolos M, Berer K, Kawakami N, Wekerle H, Krishnamoorthy G (2014) Treg cells mediate recovery from EAE by controlling effector T cell proliferation and motility in the CNS. *Acta Neuropathol Commun* 2:163.
163. Kozovska ME, Hong J, Zang YC, Li S, Rivera VM, Killian JM, Zhang JZ (1999) Interferon beta induces T-helper 2 immune deviation in MS. *Neurology* 53:1692-1697.
164. Kremer D, Aktas O, Hartung HP, Kury P (2011) The complex world of oligodendroglial differentiation inhibitors. *Ann Neurol* 69:602-618.
165. Kuboyama K, Tanga N, Suzuki R, Fujikawa A, Noda M (2017) Protamine neutralizes chondroitin sulfate proteoglycan-mediated inhibition of oligodendrocyte differentiation. *PLoS One* 12:e0189164.
166. Kuchroo VK, Anderson AC, Waldner H, Munder M, Bettelli E, Nicholson LB (2002) T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 20:101-123.
167. Kuerten S, Lichtenegger FS, Faas S, Angelov DN, Tary-Lehmann M, Lehmann PV (2006) MBP-PLP fusion protein-induced EAE in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol* 177:99-111.
168. Kuroda M, Muramatsu R, Maedera N, Koyama Y, Hamaguchi M, Fujimura H, Yoshida M, Konishi M, Itoh N, Mochizuki H, Yamashita T (2017) Peripherally derived FGF21 promotes remyelination in the central nervous system. *J Clin Invest* 127:3496-3509.
169. Kusmartsev S, Gabrilovich DI (2006) Role of immature myeloid cells in mechanisms of immune evasion in cancer. *Cancer Immunol Immunother* 55:237-245.
170. Kusmartsev S, Nefedova Y, Yoder D, Gabrilovich DI (2004) Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J Immunol* 172:989-999.
171. Kwong B, Rua R, Gao Y, Flickinger J, Jr., Wang Y, Kruhlak MJ, Zhu J, Vivier E, McGavern DB, Lazarevic V (2017) T-bet-dependent NKp46(+) innate lymphoid cells regulate the onset of TH17-induced neuroinflammation. *Nat Immunol* 18:1117-1127.
172. Lassmann H (2011) Pathophysiology of inflammation and tissue injury in multiple sclerosis: what are the targets for therapy. *J Neurol Sci* 306:167-169.
173. Lassmann H (2014) Mechanisms of white matter damage in multiple sclerosis. *Glia* 62:1816-1830.

174. Lechner MG, Liebertz DJ, Epstein AL (2010) Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 185:2273-2284.
175. Jacobson S (2018) Viruses in chronic progressive neurologic disease. *Mult Scler* 24:48-52.
176. Lelu K, Laffont S, Delpy L, Paulet PE, Perinat T, Tschanz SA, Pelletier L, Engelhardt B, Guery JC (2011) Estrogen receptor alpha signaling in T lymphocytes is required for estradiol-mediated inhibition of Th1 and Th17 cell differentiation and protection against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 187:2386-2393.
177. Leong SY, Rao VT, Bin JM, Gris P, Sangaralingam M, Kennedy TE, Antel JP (2014) Heterogeneity of oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain. *Ann Clin Transl Neurol* 1:272-283.
178. Li H, He Y, Richardson WD, Casaccia P (2009) Two-tier transcriptional control of oligodendrocyte differentiation. *Curr Opin Neurobiol* 19:479-485.
179. Li Q, Houdayer T, Liu S, Belegu V (2017) Induced Neural Activity Promotes an Oligodendroglia Regenerative Response in the Injured Spinal Cord and Improves Motor Function after Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma* 34:3351-3361.
180. Libbey JE, Fujinami RS (2011) Experimental autoimmune encephalomyelitis as a testing paradigm for adjuvants and vaccines. *Vaccine* 29:3356-3362.
181. Lu Y, Yang Y, Wang Z, Wang C, Du Q, Wang Q, Luan Z (2015) Isolation and culture of human oligodendrocyte precursor cells from neurospheres. *Brain Res Bull* 118:17-24.
182. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodríguez M, Lassmann H (1999) A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. A study of 113 cases. *Brain* 122 (Pt 12):2279-2295.
183. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodríguez M, Lassmann H (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47:707-717.
184. Madsen PM, Motti D, Karmally S, Szymkowski DE, Lambertsen KL, Bethea JR, Brambilla R (2016) Oligodendroglial TNFR2 Mediates Membrane TNF-Dependent Repair in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Promoting Oligodendrocyte Differentiation and Remyelination. *J Neurosci* 36:5128-5143.

185. Mandruzzato S, Solito S, Falisi E, Francescato S, Chiarion-Sileni V, Mocellin S, Zanon A, Rossi CR, Nitti D, Bronte V, Zanovello P (2009) IL4Ralpha+ myeloid-derived suppressor cell expansion in cancer patients. *J Immunol* 182:6562-6568.
186. Manouchehrinia A, Westerlind H, Kingwell E, Zhu F, Carruthers R, Ramanujam R, Ban M, Glaser A, Sawcer S, Tremlett H, Hillert J (2017) Age Related Multiple Sclerosis Severity Score: Disability ranked by age. *Mult Scler* 23:1938-1946.
187. Marhaba R, Vitacolonna M, Hildebrand D, Baniyash M, Freyschmidt-Paul P, Zoller M (2007) The importance of myeloid-derived suppressor cells in the regulation of autoimmune effector cells by a chronic contact eczema. *J Immunol* 179:5071-5081.
188. Martin R, Howell MD, Jaraquemada D, Flerlage M, Richert J, Brostoff S, Long EO, McFarlin DE, McFarland HF (1991) A myelin basic protein peptide is recognized by cytotoxic T cells in the context of four HLA-DR types associated with multiple sclerosis. *J Exp Med* 173:19-24.
189. Martin R, Sospedra M, Rosito M, Engelhardt B (2016) Current multiple sclerosis treatments have improved our understanding of MS autoimmune pathogenesis. *Eur J Immunol* 46:2078-2090.
190. Martín-Saavedra FM, Flores N, Dorado B, Eguíluz C, Bravo B, García-Merino A, Ballester S (2007) Beta-interferon unbalances the peripheral T cell proinflammatory response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Immunol* 44:3597-3607.
191. Mason JL, Ye P, Suzuki K, D'Ercole AJ, Matsushima GK (2000) Insulin-like growth factor-1 inhibits mature oligodendrocyte apoptosis during primary demyelination. *J Neurosci* 20:5703-5708.
192. Mastorodemos V, Ioannou M, Verginis P (2015) Cell-based modulation of autoimmune responses in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis: therapeutic implications. *Neuroimmunomodulation* 22:181-195.
193. Mastronardi FG, Min W, Wang H, Winer S, Dosch M, Boggs JM, Moscarello MA (2004) Attenuation of experimental autoimmune encephalomyelitis and nonimmune demyelination by IFN-beta plus vitamin B12: treatment to modify notch-1/sonic hedgehog balance. *J Immunol* 172:6418-6426.
194. McClain MA, Gatson NN, Powell ND, Papenfuss TL, Gienapp IE, Song F, Shawler TM, Kithcart A, Whitacre CC (2007) Pregnancy suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis through immunoregulatory

cytokine production. *J Immunol* 179:8146-8152.

195. McFarland HF (1992) Twin studies and multiple sclerosis. *Ann Neurol* 32:722-723.

196. McMurran CE, Jones CA, Fitzgerald DC, Franklin RJ (2016) CNS Remyelination and the Innate Immune System. *Front Cell Dev Biol* 4:38.

197. Mecha M, Feliu A, Carrillo-Salinas FJ, Mestre L, Guaza C (2013) Mobilization of progenitors in the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in the Theiler's virus model of multiple sclerosis: implications for remyelination at lesions sites. *Exp Neurol* 250:348-352.

198. Medina-Rodríguez EM, Arenzana FJ, Bribián A, de CF (2013) Protocol to isolate a large amount of functional oligodendrocyte precursor cells from the cerebral cortex of adult mice and humans. *PLoS One* 8:e81620.

199. Medina-Rodríguez EM, Bribián A, Boyd A, Palomo V, Pastor J, Lagares A, Gil C, Martínez A, Williams A, de CF (2017) Promoting in vivo remyelination with small molecules: a neuroreparative pharmacological treatment for Multiple Sclerosis. *Sci Rep* 7:43545.

200. Meffre D, Shackleford G, Hichor

M, Gorgievski V, Tzavara ET, Trousson A, Ghoumari AM, Deboux C, Nait OB, Liere P, Schumacher M, Baulieu EE, Charbonnier F, Grenier J, Massaad C (2015) Liver X receptors alpha and beta promote myelination and remyelination in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:7587-7592.

201. Mei F, Mayoral SR, Nobuta H, Wang F, Despons C, Lorrain DS, Xiao L, Green AJ, Rowitch D, Whistler J, Chan JR (2016) Identification of the Kappa-Opioid Receptor as a Therapeutic Target for Oligodendrocyte Remyelination. *J Neurosci* 36:7925-7935.

202. Meirow Y, Baniyash M (2017) Immune biomarkers for chronic inflammation related complications in non-cancerous and cancerous diseases. *Cancer Immunol Immunother* 66:1089-1101.

203. Melero-Jerez C, Ortega MC, Moliné-Velázquez V, Clemente D (2016) Myeloid derived suppressor cells in inflammatory conditions of the central nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1862:368-380.

204. Messmann JJ, Reisser T, Leithauser F, Lutz MB, Debatin KM, Strauss G (2015) In vitro-generated MDSCs prevent murine GVHD by inducing type 2 T cells without disabling antitumor cytotoxicity. *Blood* 126:1138-1148.

205. Mi S, Miller RH, Lee X, Scott ML,



Shulag-Morskaya S, Shao Z, Chang J, Thill G, Levesque M, Zhang M, Hession C, Sah D, Trapp B, He Z, Jung V, McCoy JM, Pepinsky RB (2005) LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nat Neurosci* 8:745-751.

206. Mi S, et al. (2009) Promotion of central nervous system remyelination by induced differentiation of oligodendrocyte precursor cells. *Ann Neurol* 65:304-315.

207. Mikita J, Dubourdieu-Cassagno N, Deloire MS, Vekris A, Biran M, Raffard G, Brochet B, Canron MH, Franconi JM, Boiziau C, Petry KG (2011) Altered M1/M2 activation patterns of monocytes in severe relapsing experimental rat model of multiple sclerosis. Amelioration of clinical status by M2 activated monocyte administration. *Mult Scler* 17:2-15.

208. Mildner A, Mack M, Schmidt H, Bruck W, Djukic M, Zabel MD, Hille A, Priller J, Prinz M (2009) CCR2+Ly-6Chi monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system. *Brain* 132:2487-2500.

209. Miller DH, Barkhof F, Frank JA, Parker GJ, Thompson AJ (2002) Measurement of atrophy in multiple sclerosis: pathological basis, methodological aspects and clinical relevance. *Brain* 125:1676-1695.

210. Miller SD, Karpus WJ (2007)

Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Curr Protoc Immunol* Chapter 15:Unit.

211. Minghetti L, Salvi R, Lavinia SM, Jimenez-Cat MA, De NC, Visentin S, Bultel-Ponce V, Oger C, Guy A, Galano JM, Greco A, Bernardo A, Durand T (2014) Nonenzymatic oxygenated metabolites of alpha-linolenic acid B1- and L1-phytoprostanes protect immature neurons from oxidant injury and promote differentiation of oligodendrocyte progenitors through PPAR-gamma activation. *Free Radic Biol Med* 73:41-50.

212. Miron VE, Boyd A, Zhao JW, Yuen TJ, Ruckh JM, Shadrach JL, van WP, Wagers AJ, Williams A, Franklin RJ, ffrench-Constant C (2013) M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci* 16:1211-1218.

213. Miron VE, Franklin RJ (2014) Macrophages and CNS remyelination. *J Neurochem* 130:165-171.

214. Mishra MK, Yong VW (2016) Myeloid cells - targets of medication in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 12:539-551.

215. Moliné-Velázquez V, Cuervo H, Vila-del Sol V, Ortega MC, Clemente D, de Castro F (2011) Myeloid-derived suppressor cells limit the inflammation by promoting T

lymphocyte apoptosis in the spinal cord of a murine model of multiple sclerosis. *Brain Pathol* 21:678-691.

216. Moliné-Velázquez V, Ortega MC, Vila-del Sol V, Melero-Jerez C, de Castro F, Clemente D (2014) The synthetic retinoid Am80 delays recovery in a model of multiple sclerosis by modulating myeloid-derived suppressor cell fate and viability. *Neurobiol Dis* 67:149-164.

217. Moliné-Velázquez V, Vila-del Sol V, de Castro F, Clemente D (2016) Myeloid cell distribution and activity in multiple sclerosis. *Histol Histopathol* 31:357-370.

218. Moline-Velázquez V, Vila-Del S, V, de CF, Clemente D (2016) Myeloid cell distribution and activity in multiple sclerosis. *Histol Histopathol* 31:357-370.

219. Molon B, Ugel S, Del PF, Soldani C, Zilio S, Avella D, De PA, Mauri P, Monegal A, Rescigno M, Savino B, Colombo P, Jonjic N, Pecanic S, Lazzarato L, Fruttero R, Gasco A, Bronte V, Viola A (2011) Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *J Exp Med* 208:1949-1962.

220. Montalban X, et al. (2017) Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 376:209-220.

221. Moore CS, Cui QL, Warsi NM, Durafour BA, Zorko N, Owen DR, Antel JP, Bar-Or A (2015) Direct and indirect effects of immune and central nervous system-resident cells on human oligodendrocyte progenitor cell differentiation. *J Immunol* 194:761-772.

222. Mount CW, Monje M (2017) Wrapped to Adapt: Experience-Dependent Myelination. *Neuron* 95:743-756.

223. Movahedi K, Guilliams M, Van den BJ, Van den BR, Gysemans C, Beschin A, De BP, Van Ginderachter JA (2008) Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 111:4233-4244.

224. Moyon S, Dubessy AL, Aigrot MS, Trotter M, Huang JK, Dauphinot L, Potier MC, Kerninon C, Melik PS, Franklin RJ, Lubetzki C (2015) Demyelination causes adult CNS progenitors to revert to an immature state and express immune cues that support their migration. *J Neurosci* 35:4-20.

225. Muls N, Jnaoui K, Dang HA, Wauters A, Van SJ, Sindic CJ, Van P, V (2012) Upregulation of IL-17, but not of IL-9, in circulating cells of CIS and relapsing MS patients. Impact of corticosteroid therapy on the cytokine network. *J Neuroimmunol* 243:73-80.

226. Mundy-Bosse BL, Lesinski GB, Jaime-Ramirez AC, Benninger K, Khan M, Kuppusamy P, Guenterberg K, Kondadasula SV, Chaudhury AR, La Perle KM, Kreiner M, Young G, Guttridge DC, Carson WE, III (2011) Myeloid-derived suppressor cell inhibition of the IFN response in tumor-bearing mice. *Cancer Res* 71:5101-5110.
227. Muraro PA, Martin R, Mancardi GL, Nicholas R, Sormani MP, Saccardi R (2017) Autologous haematopoietic stem cell transplantation for treatment of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 13:391-405.
228. Murcia-Belmonte V, Esteban PF, Martinez-Hernandez J, Gruart A, Lujan R, gado-Garcia JM, de CF (2016) Anosmin-1 over-expression regulates oligodendrocyte precursor cell proliferation, migration and myelin sheath thickness. *Brain Struct Funct* 221:1365-1385.
229. Nagaraj S, Collazo M, Corzo CA, Youn JI, Ortiz M, Quiceno D, Gabrilovich DI (2009) Regulatory myeloid suppressor cells in health and disease. *Cancer Res* 69:7503-7506.
230. Nagaraj S, Gabrilovich DI (2007) Myeloid-derived suppressor cells. *Adv Exp Med Biol* 601:213-223.
231. Nandoskar A, Raffel J, Scalfari AS, Friede T, Nicholas RS (2017) Pharmacological Approaches to the Management of Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *Drugs* 77:885-910.
232. Nielsen NM, Harpsoe M, Simonsen J, Stenager E, Magyari M, Koch-Henriksen N, Baker JL, Hjalgrim H, Frisch M, Bager P (2017a) Age at Menarche and Risk of Multiple Sclerosis: A Prospective Cohort Study Based on the Danish National Birth Cohort. *Am J Epidemiol* 185:712-719.
233. Nielsen NM, Munger KL, Koch-Henriksen N, Hougaard DM, Magyari M, Jorgensen KT, Lundqvist M, Simonsen J, Jess T, Cohen A, Stenager E, Ascherio A (2017b) Neonatal vitamin D status and risk of multiple sclerosis: A population-based case-control study. *Neurology* 88:44-51.
234. Noronha A, Toscas A, Jensen MA (1993) Interferon beta decreases T cell activation and interferon gamma production in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 46:145-153.
235. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG (2000) Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343:938-952.
236. O'Sullivan SA, Velasco-Estevez M, Dev KK (2017) Demyelination induced by oxidative stress is regulated by sphingosine 1-phosphate receptors. *Glia* 65:1119-1136.

237. Okada A, Tominaga M, Horiuchi M, Tomooka Y (2007) Plexin-A4 is expressed in oligodendrocyte precursor cells and acts as a mediator of semaphorin signals. *Biochem Biophys Res Commun* 352:158-163.
238. Otsuji M, Kimura Y, Aoe T, Okamoto Y, Saito T (1996) Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3 zeta chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13119-13124.
239. Ouzounova M, Lee E, Piranlioglu R, El AA, Kolhe R, Demirci MF, Marasco D, Asm I, Chadli A, Hassan KA, Thangaraju M, Zhou G, Arbab AS, Cowell JK, Korkaya H (2017) Monocytic and granulocytic myeloid derived suppressor cells differentially regulate spatiotemporal tumour plasticity during metastatic cascade. *Nat Commun* 8:14979.
240. Pan PY, Ma G, Weber KJ, Ozao-Choy J, Wang G, Yin B, Divino CM, Chen SH (2010) Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer Res* 70:99-108.
241. Pare A, Mailhot B, Levesque SA, Juzwik C, Ignatius Arokia Doss PM, Lecuyer MA, Prat A, Rangachari M, Fournier A, Lacroix S (2018) IL-1 β enables CNS access to CCR2(hi) monocytes and the generation of pathogenic cells through GM-LCR released by CNS endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
242. Parekh VV, Wu L, Olivares-Villagomez D, Wilson KT, Van KL (2013) Activated invariant NKT cells control central nervous system autoimmunity in a mechanism that involves myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* 190:1948-1960.
243. Patani R, Balaratnam M, Vora A, Reynolds R (2007) Remyelination can be extensive in multiple sclerosis despite a long disease course. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33:277-287.
244. Patel JR, McCandless EE, Dorsey D, Klein RS (2010) CXCR4 promotes differentiation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:11062-11067.
245. Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Bruck W, Lucchinetti C, Lassmann H (2006) Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain* 129:3165-3172.
246. Peluffo G, Piacenza L, Irigoin F, Alvarez MN, Radi R (2004) L-arginine metabolism during interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Trends Parasitol* 20:363-

247. Peranzoni E, Zilio S, Marigo I, Dolcetti L, Zanovello P, Mandruzzato S, Bronte V (2010) Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Curr Opin Immunol* 22:238-244.
248. Perfilyeva YV, Abdolla N, Ostapchuk YO, Tleulieva R, Krasnoshtanov VC, Belyaev NN (2017) Expansion of CD11b(+) Ly6G(high) and CD11b(+)CD49d(+) myeloid cells with suppressive potential in mice with chronic inflammation and light-at-night-induced circadian disruption. *Inflamm Res* 66:711-724.
249. Pettinelli CB, Fritz RB, Chou CH, McFarlin DE (1982) Encephalitogenic activity of guinea pig myelin basic protein in the SJL mouse. *J Immunol* 129:1209-1211.
250. Plemel JR, Manesh SB, Sparling JS, Tetzlaff W (2013) Myelin inhibits oligodendroglial maturation and regulates oligodendrocytic transcription factor expression. *Glia* 61:1471-1487.
251. Pogue SL, Preston BT, Stalder J, Bebbington CR, Cardarelli PM (2004) The receptor for type I IFNs is highly expressed on peripheral blood B cells and monocytes and mediates a distinct profile of differentiation and activation of these cells. *J Interferon Cytokine Res* 24:131-139.
252. Prineas JW, Barnard RO, Revesz T, Kwon EE, Sharer L, Cho ES (1993) Multiple sclerosis. Pathology of recurrent lesions. *Brain* 116 (Pt 3):681-693.
253. Prinz J, Karacivi A, Stormanns ER, Recks MS, Kuerten S (2015) Time-Dependent Progression of Demyelination and Axonal Pathology in MP4-Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *PLoS One* 10:e0144847.
254. Prinz M, Priller J, Sisodia SS, Ransohoff RM (2011) Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci* 14:1227-1235.
255. Prinz M, Schmidt H, Mildner A, Knobloch KP, Hanisch UK, Raasch J, Merkler D, Detje C, Gutcher I, Mages J, Lang R, Martin R, Gold R, Becher B, Bruck W, Kalinke U (2008) Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. *Immunity* 28:675-686.
256. Psachoulia K, Chamberlain KA, Heo D, Davis SE, Paskus JD, Nanescu SE, Dupree JL, Wynn TA, Huang JK (2016) IL4I1 augments CNS remyelination and axonal protection by modulating T cell driven inflammation. *Brain*

257. Raff MC, Miller RH, Noble M (1983) A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 303:390-396.

258. Raine CS (1994) The Dale E. McFarlin Memorial Lecture: the immunology of the multiple sclerosis lesion. *Ann Neurol* 36 Suppl:S61-S72.

259. Ramadan A, Lucca LE, Carrie N, Desbois S, Axisa PP, Hayder M, Bauer J, Liblau RS, Mars LT (2016) In situ expansion of T cells that recognize distinct self-antigens sustains autoimmunity in the CNS. *Brain* 139:1433-1446.

260. Rapalino O, Lazarov-Spiegler O, Agranov E, Velan GJ, Yoles E, Fraidakis M, Solomon A, Gepstein R, Katz A, Belkin M, Hadani M, Schwartz M (1998) Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat Med* 4:814-821.

261. Rawji KS, Yong VW (2013) The benefits and detriments of macrophages/microglia in models of multiple sclerosis. *Clin Dev Immunol* 2013:948976.

262. Redd PS, Ibrahim ML, Klement

JD, Sharman SK, Paschall AV, Yang D, Nayak-Kapoor A, Liu K (2017) SETD1B Activates iNOS Expression in Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res* 77:2834-2843.

263. Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA (2018) Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 378:169-180.

264. Ribechini E, Greifenberg V, Sandwick S, Lutz MB (2010) Subsets, expansion and activation of myeloid-derived suppressor cells. *Med Microbiol Immunol* 199:273-281.

265. Ribechini E, et al. (2017) Novel GM-CSF signals via IFN-gammaR/IRF-1 and AKT/mTOR license monocytes for suppressor function. *Blood Adv* 1:947-960.

266. Richardson WD, Kessaris N, Pringle N (2006) Oligodendrocyte wars. *Nat Rev Neurosci* 7:11-18.

267. Rodríguez PC, Ernstoff MS, Hernandez C, Atkins M, Zabaleta J, Sierra R, Ochoa AC (2009) Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res* 69:1553-1560.

268. Rodríguez PC, Ochoa AC (2008) Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives.

269. Rodríguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC (2007) L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* 109:1568-1573.

270. Rojas JI, Sanchez F, Patrucco L, Miguez J, Funes J, Cristiano E (2016) Structural sex differences at disease onset in multiple sclerosis patients. *Neuroradiol J* 29:368-371.

271. Rosenberg SS, Kelland EE, Tokar E, De la Torre AR, Chan JR (2008) The geometric and spatial constraints of the microenvironment induce oligodendrocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:14662-14667.

272. Rovira A, Wattjes MP, Tintore M, Tur C, Yousry TA, Sormani MP, De SN, Filippi M, Auger C, Rocca MA, Barkhof F, Fazekas F, Kappos L, Polman C, Miller D, Montalban X (2015) Evidence-based guidelines: MAGNIMS consensus guidelines on the use of MRI in multiple sclerosis-clinical implementation in the diagnostic process. *Nat Rev Neurol* 11:471-482.

273. Rowitch DH, Kriegstein AR (2010) Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* 468:214-222.

274. Rudick RA, Carpenter CS, Cookfair DL, Tuohy VK, Ransohoff RM (1993) In vitro

and in vivo inhibition of mitogen-driven T-cell activation by recombinant interferon beta. *Neurology* 43:2080-2087.

275. Sadovnick AD, Traboulsee AL, Zhao Y, Bernales CQ, Encarnacion M, Ross JP, Yee IM, Criscuoli MG, Vilarino-Guell C (2017) Genetic modifiers of multiple sclerosis progression, severity and onset. *Clin Immunol* 180:100-105.

276. Saederup N, Cardona AE, Croft K, Mizutani M, Cofleur AC, Tsou CL, Ransohoff RM, Charo IF (2010) Selective chemokine receptor usage by central nervous system myeloid cells in CCR2-red fluorescent protein knock-in mice. *PLoS One* 5:e13693.

277. Saidha S, Al-Louzi O, Ratchford JN, Bhargava P, Oh J, Newsome SD, Prince JL, Pham D, Roy S, van ZP, Balcer LJ, Frohman EM, Reich DS, Crainiceanu C, Calabresi PA (2015) Optical coherence tomography reflects brain atrophy in multiple sclerosis: A four-year study. *Ann Neurol* 78:801-813.

278. Saiwai H, Kumamaru H, Ohkawa Y, Kubota K, Kobayakawa K, Yamada H, Yokomizo T, Iwamoto Y, Okada S (2013) Ly6C+ Ly6G- Myeloid-derived suppressor cells play a critical role in the resolution of acute inflammation and the subsequent tissue repair process after spinal cord injury. *J Neurochem* 125:74-88.

279. Scheller M, Foerster J, Heyworth CM, Waring JF, Lohler J, Gilmore GL, Shadduck RK, Dexter TM, Horak I (1999) Altered development and cytokine responses of myeloid progenitors in the absence of transcription factor, interferon consensus sequence binding protein. *Blood* 94:3764-3771.
280. Schiefenhover F, Immig K, Prodinger C, Bechmann I (2017) Indications for cellular migration from the central nervous system to its draining lymph nodes in CD11c-GFP(+) bone-marrow chimeras following EAE. *Exp Brain Res* 235:2151-2166.
281. Schreiber G (2017) The molecular basis for differential type I interferon signaling. *J Biol Chem* 292:7285-7294.
282. Segal BM, Constantinescu CS, Raychaudhuri A, Kim L, Fidelus-Gort R, Kasper LH (2008) Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study. *Lancet Neurol* 7:796-804.
283. Serafini P, Borrello I, Bronte V (2006) Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin Cancer Biol* 16:53-65.
284. Serafini P, Mgebroff S, Noonan K, Borrello I (2008) Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Res* 68:5439-5449.
285. Serbina NV, Pamer EG (2006) Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol* 7:311-317.
286. Seung LP, Rowley DA, Dubey P, Schreiber H (1995) Synergy between T-cell immunity and inhibition of paracrine stimulation causes tumor rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6254-6258.
287. Shechter R, London A, Varol C, Raposo C, Cusimano M, Yovel G, Rolls A, Mack M, Pluchino S, Martino G, Jung S, Schwartz M (2009) Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PLoS Med* 6:e1000113.
288. Shechter R, Miller O, Yovel G, Rosenzweig N, London A, Ruckh J, Kim KW, Klein E, Kalchenko V, Bendel P, Lira SA, Jung S, Schwartz M (2013) Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus. *Immunity* 38:555-569.



289. Shechter R, Raposo C, London A, Sagi I, Schwartz M (2011) The glial scar-monocyte interplay: a pivotal resolution phase in spinal cord repair. *PLoS One* 6:e27969.
290. Shechter R, Schwartz M (2013) Harnessing monocyte-derived macrophages to control central nervous system pathologies: no longer 'if' but 'how'. *J Pathol* 229:332-346.
291. Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Goldman JE, Sekino Y, Sato K (2014) Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. *J Neurosci* 34:2231-2243.
292. Si Y, Tsou CL, Croft K, Charo IF (2010) CCR2 mediates hematopoietic stem and progenitor cell trafficking to sites of inflammation in mice. *J Clin Invest* 120:1192-1203.
293. Silver J, Miller JH (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 5:146-156.
294. Slaney CY, Toker A, La FA, Backstrom BT, Harper JL (2011) Naive blood monocytes suppress T-cell function. A possible mechanism for protection from autoimmunity. *Immunol Cell Biol* 89:7-13.
295. Sloane JA, Batt C, Ma Y, Harris ZM, Trapp B, Vartanian T (2010) Hyaluronan blocks oligodendrocyte progenitor maturation and remyelination through TLR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:11555-11560.
296. Sonda N, Chioda M, Zilio S, Simonato F, Bronte V (2011) Transcription factors in myeloid-derived suppressor cell recruitment and function. *Curr Opin Immunol* 23:279-285.
297. Sospedra M, Martin R (2005) Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23:683-747.
298. Spassky N, de CF, Le BB, Heydon K, Queraud-LeSaux F, Bloch-Gallego E, Chedotal A, Zalc B, Thomas JL (2002) Directional guidance of oligodendroglial migration by class 3 semaphorins and netrin-1. *J Neurosci* 22:5992-6004.
299. Stewart TJ, Greeneltch KM, Reid JE, Liewehr DJ, Steinberg SM, Liu K, Abrams SI (2009) Interferon regulatory factor-8 modulates the development of tumour-induced CD11b+Gr-1+ myeloid cells. *J Cell Mol Med* 13:3939-3950.
300. Stone LA, Frank JA, Albert PS, Bash C, Smith ME, Maloni H, McFarland HF (1995) The effect of interferon-beta on blood-brain barrier disruptions demonstrated by contrast-enhanced magnetic resonance imaging in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann*

301. Stuve O, Cree BC, von Budingen HC, Yousef S, Bowen JD, Genain CP, Hauser SL, Steinman L, Zamvil SS (2002) Approved and future pharmacotherapy for multiple sclerosis. *Neurologist* 8:290-301.

302. Suardíaz M, Clemente D, Marín-Bañasco C, Orpez T, Hurtado-Guerrero I, Pavia J, Pinto-Medel MJ, de Castro F., Leyva L, Fernández O, Oliver B (2016) Recombinant soluble IFN receptor (sIFNAR2) exhibits intrinsic therapeutic efficacy in a murine model of Multiple Sclerosis. *Neuropharmacology* 110:480-492.

303. Sun Y, Deng Y, Xiao M, Hu L, Li Z, Chen C (2017) Chondroitin sulfate proteoglycans inhibit the migration and differentiation of oligodendrocyte precursor cells and its counteractive interaction with laminin. *Int J Mol Med* 40:1657-1668.

304. Sunderkotter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van RN, Stehling M, Drevets DA, Leenen PJ (2004) Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* 172:4410-4417.

305. Sweeney CM, Lonergan R, Basdeo SA, Kinsella K, Dungan LS, Higgins SC, Kelly PJ, Costelloe L, Tubridy N, Mills KH, Fletcher

JM (2011) IL-27 mediates the response to IFN-beta therapy in multiple sclerosis patients by inhibiting Th17 cells. *Brain Behav Immun* 25:1170-1181.

306. Taleb K, Auffray C, Villefroy P, Pereira A, Hosmalin A, Gaudry M, Le BA (2017) Chronic Type I IFN Is Sufficient To Promote Immunosuppression through Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *J Immunol* 198:1156-1163.

307. Talmadge JE, Gabrilovich DI (2013) History of myeloid-derived suppressor cells. *Nat Rev Cancer* 13:739-752.

308. Tarassishin L, Suh HS, Lee SC (2011) Interferon regulatory factor 3 plays an anti-inflammatory role in microglia by activating the PI3K/Akt pathway. *J Neuroinflammation* 8:187.

309. Taylor DL, Pirianov G, Holland S, McGinnity CJ, Norman AL, Reali C, Diemel LT, Gveric D, Yeung D, Mehmet H (2010) Attenuation of proliferation in oligodendrocyte precursor cells by activated microglia. *J Neurosci Res* 88:1632-1644.

310. Teige I, Liu Y, Issazadeh-Navikas S (2006) IFN-beta inhibits T cell activation capacity of central nervous system APCs. *J Immunol* 177:3542-3553.



311. Thompson AJ, et al. (2018) Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* 17:162-173.
312. Trapp BD, Nave KA (2008) Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci* 31:247-269.
313. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L (1998) Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 338:278-285.
314. Trinschek B, Luessi F, Gross CC, Wiendl H, Jonuleit H (2015) Interferon-Beta Therapy of Multiple Sclerosis Patients Improves the Responsiveness of T Cells for Immune Suppression by Regulatory T Cells. *Int J Mol Sci* 16:16330-16346.
315. Tsai HH, Frost E, To V, Robinson S, French-Constant C, Geertman R, Ransohoff RM, Miller RH (2002) The chemokine receptor CXCR2 controls positioning of oligodendrocyte precursors in developing spinal cord by arresting their migration. *Cell* 110:373-383.
316. Tsai HH, Niu J, Munji R, Davalos D, Chang J, Zhang H, Tien AC, Kuo CJ, Chan JR, Daneman R, Fancy SP (2016) Oligodendrocyte precursors migrate along vasculature in the developing nervous system. *Science* 351:379-384.
317. Tuohy VK, Sobel RA, Lees MB (1988) Myelin proteolipid protein-induced experimental allergic encephalomyelitis. Variations of disease expression in different strains of mice. *J Immunol* 140:1868-1873.
318. Udalova IA, Mantovani A, Feldmann M (2016) Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 12:472-485.
319. van Horssen J., Bo L, Dijkstra CD, de Vries HE (2006) Extensive extracellular matrix depositions in active multiple sclerosis lesions. *Neurobiol Dis* 24:484-491.
320. van Tilborg E., de Theije CGM, van HM, Wagenaar N, de Vries LS, Benders MJ, Rowitch DH, Nijboer CH (2018) Origin and dynamics of oligodendrocytes in the developing brain: Implications for perinatal white matter injury. *Glia* 66:221-238.
321. van Zwam M., Huizinga R, Melief MJ, Wierenga-Wolf AF, van MM, Voerman JS, Biber KP, Boddeke HW, Hopken UE, Meisel C, Meisel A, Bechmann I, Hintzen RQ, 't Hart BA, Amor S, Laman JD, Boven LA (2009) Brain antigens in functionally distinct antigen-presenting cell populations in cervical lymph nodes in MS and EAE. *J Mol Med (Berl)* 87:273-286.
322. Veglia F, Perego M, Gabrilovich

D (2018) Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat Immunol* 19:108-119.

323. Vendramin A, Gimondi S, Bermema A, Longoni P, Rizzitano S, Corradini P, Carniti C (2014) Graft monocytic myeloid-derived suppressor cell content predicts the risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 20:2049-2055.

324. Verschoor CP, Johnstone J, Millar J, Dorrington MG, Habibagahi M, Lelic A, Loeb M, Bramson JL, Bowdish DM (2013) Blood CD33(+)HLA-DR(-) myeloid-derived suppressor cells are increased with age and a history of cancer. *J Leukoc Biol* 93:633-637.

325. Villar LM, Sadaba MC, Roldan E, Masjuan J, Gonzalez-Porque P, Villarrubia N, Espino M, Garcia-Trujillo JA, Bootello A, varez-Cermeno JC (2005) Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J Clin Invest* 115:187-194.

326. Vogel DY, Vereyken EJ, Glim JE, Heijnen PD, Moeton M, van d, V, Amor S, Teunissen CE, van HJ, Dijkstra CD (2013) Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. *J Neuroinflammation* 10:35.

327. Wang W, Jiao Z, Duan T, Liu M, Zhu B, Zhang Y, Xu Q, Wang R, Xiong Y, Xu H, Lu L (2015) Functional characterization of myeloid-derived suppressor cell subpopulations during the development of experimental arthritis. *Eur J Immunol* 45:464-473.

328. Waters RS, Perry JS, Han S, Bielekova B, Gedeon T (2017) The effects of interleukin-2 on immune response regulation. *Math Med Biol.*

329. Waubant E, Goodkin D, Bostrom A, Bacchetti P, Hietpas J, Lindberg R, Leppert D (2003) IFN β lowers MMP-9/TIMP-1 ratio, which predicts new enhancing lesions in patients with SPMS. *Neurology* 60:52-57.

330. Wegner C, Esiri MM, Chance SA, Palace J, Matthews PM (2006) Neocortical neuronal, synaptic, and glial loss in multiple sclerosis. *Neurology* 67:960-967.

331. Weideman AM, Barbour C, Tapia-Maltos MA, Tran T, Jackson K, Kosa P, Komori M, Wichman A, Johnson K, Greenwood M, Bielekova B (2017) New Multiple Sclerosis Disease Severity Scale Predicts Future Accumulation of Disability. *Front Neurol* 8:598.

332. Werneburg S, Fuchs HLS, Albers I, Burkhardt H, Gudi V, Skripuletz T, Stangel M, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H (2017) Polysialylation at Early Stages of Oligodendrocyte

Differentiation Promotes Myelin Repair. *J Neurosci* 37:8131-8141.

333. Wilck N, et al. (2017) Salt-responsive gut commensal modulates TH17 axis and disease. *Nature* 551:585-589.

334. Wlodarczyk A, Cedile O, Jensen KN, Jasson A, Mony JT, Khorrooshi R, Owens T (2015) Pathologic and Protective Roles for Microglial Subsets and Bone Marrow- and Blood-Derived Myeloid Cells in Central Nervous System Inflammation. *Front Immunol* 6:463.

335. Wolswijk G (1998) Chronic stage multiple sclerosis lesions contain a relatively quiescent population of oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci* 18:601-609.

336. Wong CS, Fehlings MG, Sahgal A (2015) Pathobiology of radiation myelopathy and strategies to mitigate injury. *Spinal Cord* 53:574-580.

337. Wu C, Rauch U, Korpos E, Song J, Loser K, Crocker PR, Sorokin LM (2009) Sialoadhesin-positive macrophages bind regulatory T cells, negatively controlling their expansion and autoimmune disease progression. *J Immunol* 182:6508-6516.

338. Wu X, Qu X, Zhang Q, Dong F, Yu H, Yan C, Qi D, Wang M, Liu X, Yao R (2014) Quercetin promotes proliferation and

differentiation of oligodendrocyte precursor cells after oxygen/glucose deprivation-induced injury. *Cell Mol Neurobiol* 34:463-471.

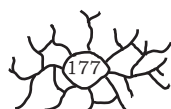
339. Wucherpfennig KW, Sette A, Southwood S, Oseroff C, Matsui M, Strominger JL, Hafler DA (1994) Structural requirements for binding of an immunodominant myelin basic protein peptide to DR2 isotypes and for its recognition by human T cell clones. *J Exp Med* 179:279-290.

340. Xu L, Hilliard B, Carmody RJ, Tsabary G, Shin H, Christianson DW, Chen YH (2003) Arginase and autoimmune inflammation in the central nervous system. *Immunology* 110:141-148.

341. Yamasaki R, et al. (2014) Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med* 211:1533-1549.

342. Yang R, Cai Z, Zhang Y, Yutzy WH, Roby KF, Roden RB (2006) CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1+CD11b+ myeloid cells. *Cancer Res* 66:6807-6815.

343. Yin B, Ma G, Yen CY, Zhou Z, Wang GX, Divino CM, Casares S, Chen SH, Yang WC, Pan PY (2010) Myeloid-derived suppressor cells prevent type 1 diabetes in murine models. *J Immunol* 185:5828-5834.



344. Youn JI, Collazo M, Shalova IN, Biswas SK, Gabrilovich DI (2012) Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Leukoc Biol* 91:167-181.
345. Youn JI, Gabrilovich DI (2010) The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *Eur J Immunol* 40:2969-2975.
346. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI (2008) Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* 181:5791-5802.
347. Young DC, Wagner K, Griffin JD (1987a) Constitutive expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene in acute myeloblastic leukemia. *J Clin Invest* 79:100-106.
348. Young MR, Newby M, Wepsic HT (1987b) Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer Res* 47:100-105.
349. Yuan J, Ge H, Liu W, Zhu H, Chen Y, Zhang X, Yang Y, Yin Y, Chen W, Wu W, Yang Y, Lin J (2017) M2 microglia promotes neurogenesis and oligodendrogenesis from neural stem/progenitor cells via the PPARgamma signaling pathway. *Oncotarget* 8:19855-19865.
350. Yuen TJ, Johnson KR, Miron VE, Zhao C, Quandt J, Harrisingh MC, Swire M, Williams A, McFarland HF, Franklin RJ, ffrench-Constant C (2013) Identification of endothelin 2 as an inflammatory factor that promotes central nervous system remyelination. *Brain* 136:1035-1047.
351. Zea AH, Rodríguez PC, Atkins MB, Hernandez C, Signoretti S, Zabaleta J, McDermott D, Quiceno D, Youmans A, O'Neill A, Mier J, Ochoa AC (2005) Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res* 65:3044-3048.
352. Zhang H, Jarjour AA, Boyd A, Williams A (2011) Central nervous system remyelination in culture--a tool for multiple sclerosis research. *Exp Neurol* 230:138-148.
353. Zhang H, Vutskits L, Calaora V, Durbec P, Kiss JZ (2004) A role for the polysialic acid-neural cell adhesion molecule in PDGF-induced chemotaxis of oligodendrocyte precursor cells. *J Cell Sci* 117:93-103.
354. Zhang J, Zhang ZG, Li Y, Ding X, Shang X, Lu M, Elias SB, Chopp M (2015) Fingolimod treatment promotes proliferation and differentiation of oligodendrocyte

progenitor cells in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurobiol Dis* 76:57-66.

355. Zhang L, Goldman JE (1996) Developmental fates and migratory pathways of dividing progenitors in the postnatal rat cerebellum. *J Comp Neurol* 370:536-550.

356. Zhang M, Caragine T, Wang H, Cohen PS, Botchkina G, Soda K, Bianchi M, Ulrich P, Cerami A, Sherry B, Tracey KJ (1997) Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: a counterregulatory mechanism that restrains the immune response. *J Exp Med* 185:1759-1768.

357. Zhang Y, Argaw AT, Gurfein BT, Zameer A, Snyder BJ, Ge C, Lu QR, Rowitch DH, Raine CS, Brosnan CF, John GR (2009) Notch1 signaling plays a role in regulating precursor differentiation during CNS remyelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:19162-19167.

358. Zhao Q, Cheng W, Xi Y, Cao Z, Xu Y, Wu T, Li C, Niu X, Chen G (2018) IFN-beta regulates Th17 differentiation partly through the inhibition of osteopontin in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Immunol* 93:20-30.

359. Zhu B, Bando Y, Xiao S, Yang K, Anderson AC, Kuchroo VK, Khoury SJ (2007) CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in

experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 179:5228-5237.

360. Zhu B, Kennedy JK, Wang Y, Sandoval-Garcia C, Cao L, Xiao S, Wu C, Elyaman W, Khoury SJ (2011) Plasticity of Ly-6C(hi) myeloid cells in T cell regulation. *J Immunol* 187:2418-2432.

361. Zhu M, Huang X, Yi S, Sun H, Zhou J (2017) High granulocytic myeloid-derived suppressor cell levels in the peripheral blood predict a better IVF treatment outcome. *J Matern Fetal Neonatal Med* 1-6.

362. Zuvich RL, McCauley JL, Pericak-Vance MA, Haines JL (2009) Genetics and pathogenesis of multiple sclerosis. *Semin Immunol* 21:328-333.



FIN

